



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 : C07D 471/04, A61K 31/415	A1	(11) International Publication Number: WO 99/51594 (43) International Publication Date: 14 October 1999 (14.10.99)
--	----	---

(21) International Application Number: PCT/AU99/00254

(22) International Filing Date: 6 April 1999 (06.04.99)

(30) Priority Data:
PP 2784 3 April 1998 (03.04.98) AU

(71) Applicant (for all designated States except US): AUSTRALIAN NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY ORGANISATION [AU/AU]; New Illawarra Road, Lucas Heights, NSW 2234 (AU).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KATSIFIS, Andrew [AU/AU]; 33 Valentia Avenue, Lugarno, NSW 2210 (AU). MATTNER, Filomena [AU/AU]; 19 Lorikeet Avenue, Ingleburn, NSW 2565 (AU). MARDON, Karin [FR/AU]; 3/135 Gerrale Street, Cronulla, NSW 2230 (AU). PAPAIZIAN, Vahan [AU/AU]; 1 Murray Street, Smithfield, NSW 2164 (AU). DIKIC, Branko [AU/AU]; 91 Iola Avenue, Farmborough Heights, Wollongong, NSW 2526 (AU).

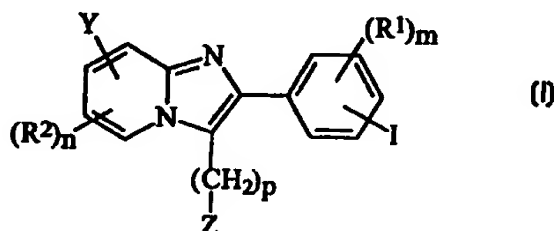
(74) Agent: SPRUSON & FERGUSON; G.P.O. Box 3898, Sydney, NSW 2001 (AU).

(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published

With international search report.

(54) Title: IMIDAZO[1,2-a]PYRIDINES AS PERIPHERAL BENZODIAZEPINE RECEPTOR BINDING AGENTS



(57) Abstract

The invention provides imidazo[1,2-a]pyridines of formula (I), wherein Y is selected from F, Cl, Br, I, OH, SH, NH₂, CN and COOH; Z is selected from N(R³)C(O)R⁴ and C(O)NR³R⁴; R¹, R², R³, R⁴ can represent various radicals; m and n are independently 0, 1 or 2; and p is an integer from 1 to 4; radiolabelled derivatives and pharmaceutical compositions thereof. The compounds of the invention are useful for the diagnosis and treatment, including radiotherapy, of disorders which are characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

IMIDAZO[1,2-a]PYRIDINES AS PERIPHERAL BENZODIAZEPINE RECEPTOR BINDING AGENTS

Technical Field

The present invention relates to radiolabelled imidazo[1,2-a]pyridines and related compounds which bind to peripheral benzodiazepine receptors and are useful for imaging such receptors and providing therapeutic treatment including radiotherapy.

Background of the Invention

The peripheral benzodiazepine receptors, which are also commonly referred to as the mitochondrial benzodiazepine receptors or ω -3-receptors, are distinct from the central benzodiazepine receptors in their pharmacology, subcellular location and structural requirements. Peripheral benzodiazepine receptors are predominantly found in the peripheral organs such as kidney, heart, adrenal cortex, testis, ovaries, plasma (platelets) as well as in the glial cells and olfactory bulbs in the brain. It has also been reported that peripheral benzodiazepine receptor density is higher in tumours, such as glioma, ovarian and colon carcinoma, than in corresponding normal tissue. Recently high concentration of peripheral benzodiazepine receptors has been reported in Dunning rat prostate tumours compared to the normal ventral or dorsolateral prostate.

The peripheral benzodiazepine receptors appear to be associated (but not exclusively) with the outer mitochondrial membrane in many tissues where they are modulated by hormones and drugs and reflect the effects of emotional stress, and hypertension. Peripheral benzodiazepine receptors in the brain have been investigated for use as markers of neurodegeneration including Huntington's disease, Alzheimer's disease, anxiety, stress, emotional disturbances, cognitive impairment, stroke, and cerebral ischemia. Several classes of ligands have been shown to exhibit high affinity binding to the peripheral benzodiazepine receptor, the most widely investigated being the benzodiazepine Ro 5-4864 (7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one) and the isoquinoline PK-11195 (1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide). Labelled with ^{11}C , ^{18}F and ^{123}I , these ligands have been used to map peripheral benzodiazepine receptors in the human heart and brain. Enhanced uptake of [^3H]PK-11195 has been reported in a variety of tumour cells including breast, ovarian, prostate, adrenal, brain and colon. Radiolabelling with suitable levels of radioactive iodine may be used firstly to diagnose these tumours (using radiolabels such as ^{123}I or ^{131}I) and subsequently to treat them with therapeutic doses (for instance using ^{123}I , ^{125}I or ^{131}I). Furthermore, recent work has also revealed the existence of several binding domains which differ in affinity for isoquinoline and benzodiazepine ligands at different organs and species.

Various 2-aryl substituted imidazo[1,2-a]pyridines having anxiolytic, hypnotic, anticonvulsant, analgesic and other properties have been reported. For example ^{123}I labelled 6-methyl-(4'-iodophenyl)imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N,N-dimethyl)acetamide

has been reported as a potential tracer for the study of the peripheral benzodiazepine receptor using SPECT.

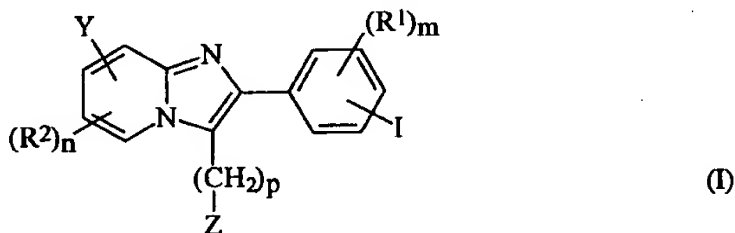
However, the compounds which have been described previously typically exhibit strong binding to the central benzodiazepine receptors, even if they also bind to peripheral benzodiazepine receptors. Hence, the prior art compounds are not sufficiently selective for peripheral benzodiazepine receptors to be useful for diagnosis or therapy of conditions associated with a high density of those receptors. Thus there is a need for substances that bind strongly to peripheral benzodiazepine receptors but do not bind strongly to central benzodiazepine receptors.

Surprisingly, the present inventors have discovered that certain 2-(iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridines having an electronegative substituent, especially halogen, in the pyridine nucleus exhibit strong binding to peripheral benzodiazepine receptors and much weaker binding to central benzodiazepine receptors. Hence the compounds of the present invention have superior properties, as far as the PET and SPECT imaging of peripheral benzodiazepine receptors is concerned, compared to related substances which have been reported previously.

The compounds of the present invention, appropriately labelled, are clinically useful in SPECT and PET scanning, for example to detect those cancers which express high density of the peripheral benzodiazepine receptors and/or to detect, or non-invasively diagnose, neurodegenerative disorders. The compounds of the present invention are also useful for the treatment of disorders characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors, such as neurodegenerative disorders and tumours.

Summary of the Invention

In a first embodiment, the invention provides a compound of formula (I)



25

wherein

Y is selected from F, Cl, Br, I, OH, SH, NH₂, CN, and COOH;

Z is selected from N(R³)C(O)R⁴ and C(O)NR³R⁴;

R¹ and R² are independently selected from (C₁-C₆)alkyl, (C₁-C₆)alkoxy, (C₂-C₆)alkenyl, (C₂-C₆)alkynyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, (C₆-C₁₂)aryl, (C₆-C₁₂)aryloxy, (C₆-C₁₂)aryl(C₁-C₆)alkyl, heteroaryl, heteroaryl(C₁-C₆)alkyl, heterocyclic, (C₂-C₆)alkanoyl and (C₂-C₇)acyl, each of which may be unsubstituted or substituted with from 1 to 3 substituents selected from the group consisting of halogen, OH, (C₁-C₄)alkoxy, SH, NH₂,

(C₁-C₄)alkylamino, di((C₁-C₄)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₄)alkoxycarbonyl, (C₂-C₄)alkanoyl, oxo, amido, CN, CNS, SCN, CNO, OCN, and NHOH;

R³ and R⁴ are each independently hydrogen or a group selected from (C₁-C₄)alkyl, (C₂-C₄)alkenyl, (C₂-C₄)alkynyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, (C₆-C₁₂)aryl, (C₆-C₁₂)aryl(C₁-C₄)alkyl, heteroaryl, heteroaryl(C₁-C₄)alkyl, heterocyclic, (C₁-C₄)alkoxycarbonyl and (C₂-C₅)acyl, each of which may be unsubstituted or substituted with from 1 to 3 substituents selected from the group consisting of halogen, OH, (C₁-C₄)alkoxy, SH, NH₂, (C₁-C₄)alkylamino, di((C₁-C₄)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₄)alkoxycarbonyl, (C₁-C₄)alkanoyl, oxo, amido, CN, CNS, SCN, CNO, OCN, and NHOH,

or R³ and R⁴ together are (C₂-C₇) alkylidene which may be optionally substituted with from 1 to 3 substituents selected from the group consisting of halogen, OH, (C₁-C₄)alkoxy, SH, NH₂, (C₁-C₄)alkylamino, di((C₁-C₄)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₄)alkoxycarbonyl, (C₁-C₄)alkanoyl, oxo, amido, CN, CNS, SCN, CNO, OCN, and NHOH;

m and n are independently 0, 1 or 2; and

p is an integer from 1 to 4.

In a second embodiment, the invention provides a compound of the first embodiment which is radiolabelled.

The invention further provides a pharmaceutical composition including a compound of the first or second embodiment together with at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent, excipient or adjuvant.

In a third embodiment, the invention further provides a method for diagnosis of a disorder in a mammal characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors, the method including the steps of:

administering to the mammal an amount of a radiolabelled compound of the second embodiment sufficient to allow a detectable image of the location of the radiolabel in the body of the mammal to be recorded;

recording a image of the distribution of the radiolabel in at least part of the body of the mammal; and

diagnosing the presence or absence of the disorder from the image.

In a fourth embodiment, the invention provides a method for the treatment of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said treatment, the method including administering to the mammal an effective amount of a compound of the first embodiment, or a pharmaceutical composition thereof.

In a fifth embodiment, the invention provides a method for the radiotherapy of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said radiotherapy, the method including administering to the mammal an effective amount of a compound of the second embodiment, or a pharmaceutical composition thereof.

In a sixth embodiment, the invention provides the use of a compound of the second embodiment for the manufacture of a diagnostic composition for the diagnosis of a disorder in a mammal characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors.

5 In a seventh embodiment, the invention provides the use of a compound of the first embodiment for the manufacture of a medicament for the treatment of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said treatment.

10 In an eighth embodiment, the invention provides the use of a compound of the second embodiment for the manufacture of a medicament for the radiotherapy of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said radiotherapy.

In a ninth embodiment, the invention provides a compound of the second embodiment when used in a method of the third embodiment.

15 In a tenth embodiment, the invention provides a compound of the first embodiment when used in a method of the fourth embodiment.

In an eleventh embodiment, the invention provides a compound of the second embodiment when used in a method of the fifth embodiment.

Detailed Description of the Invention

20 As used herein, the term "alkyl" includes within its meaning straight and branched chain alkyl groups. Examples of such groups are methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, amyl, isoamyl, sec-amyl, 1,2-dimethylpropyl, 1,1-dimethyl-propyl, hexyl, 4-methylpentyl, 1-methylpentyl, 2-methylpentyl, 3-methylpentyl, 1,1-dimethylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 3,3-dimethylbutyl, 1,2-dimethylbutyl, 1,3-
25 dimethylbutyl, 1,2,2-trimethylpropyl and 1,1,2-trimethylpropyl.

As used herein, the term "cycloalkyl" refers to cyclic alkyl groups, or alkyl substituted cyclic alkyl groups. Examples of such groups include cyclopropyl, methylcyclopropyl, cyclobutyl, methylcyclobutyl, cyclopentyl, methylcyclopentyl, cyclohexyl and the like.

30 As used herein, the term "alkoxy" refers to a group of the formula alkyl-O-, wherein the alkyl group is as defined above.

As used herein, the term "alkenyl" includes within its meaning ethylenically mono- or di-unsaturated alkyl or cycloalkyl groups as previously defined. Examples of such alkenyl groups are vinyl, allyl, 1-methylvinyl, butenyl, iso-butenyl, 3-methyl-2-butenyl, 35 1-pentenyl, cyclopentenyl, 1-methyl-cyclopentenyl, 1-hexenyl, 3-hexenyl, cyclohexenyl, 1,3-butadienyl, 1,4-pentadienyl, 1,3-cyclopentadienyl, 1,3-hexadienyl, 1,4-hexadienyl, 1,3-cyclohexadienyl and 1,4-cyclohexadienyl.

As used herein, the term "alkynyl" includes within its meaning acetylenically unsaturated alkyl groups as previously defined. Examples of such alkynyl groups are

ethynyl, propynyl, n-butyryl, n-pentyryl, 3-methyl-1-butyryl, n-hexynyl and methyl-pentyryl.

As used herein, the term "alkylidene" refers to optionally unsaturated divalent alkyl radicals. Examples of such radicals are $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{CH}_2)_4-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$, and $-(\text{CH}_2)_r-$ where r is 5-7. The term also refers to optionally unsaturated divalent alkyl radicals in which one or more of the bonds of the radical form part of a cyclic system.

As used herein, the term "aryl" refers to single, polynuclear, conjugated and fused residues of aromatic hydrocarbons. Examples of such groups are phenyl, biphenyl, naphthyl, tetrahydronaphthyl, indenyl and azulenyl. Any available position of the aromatic residue can be used for attachment to the remainder of the molecule of formula (I).

As used herein, the term "aryloxy" refers to a group of the formula aryl-O-, wherein the aryl group is as defined above.

As used herein, the term "heteroaryl" refers to single, polynuclear, conjugated and fused residues of aromatic heterocyclic ring systems. Examples of such groups are pyridyl, 4-phenylpyridyl, 3-phenylpyridyl, thienyl, furyl, pyrrolyl, indolyl, pyridazinyl, pyrazolyl, pyrazinyl, thiazolyl, pyrimidinyl, quinolinyl, isoquinolinyl, benzofuranyl, benzothienyl, purinyl, quinazolinyl, phenazinyl, acridinyl, benzoxazolyl, benzothiazolyl and the like. Any available position of the heteroaromatic residue can be used for attachment to the remainder of the molecule of formula (I).

As used herein, the term "heterocyclic" refers to any 3- to 12-membered monocyclic, bicyclic or polycyclic ring containing, for 3- and 4-membered rings, one heteroatom; for 5-membered rings, one or two heteroatoms; for 6- and 7-membered rings, one to three heteroatoms; for 8- and 9-membered rings, from one to four heteroatoms; for 10- and 11-membered rings, from one to five heteroatoms; for 12-membered rings, from one to six heteroatoms; the heteroatom(s) being independently selected from oxygen, nitrogen and sulphur. The term "heterocyclic" includes any group in which a heterocyclic ring is fused to a benzene ring. Examples of heterocyclics are pyrrolyl, pyrimidinyl, quinolinyl, isoquinolinyl, indolyl, piperidinyl, pyridinyl, furyl, thiophenyl, tetrahydrofuryl, imidazolyl, oxazolyl, thiazolyl, pyrenyl, oxazolidinyl, isoxazolyl, isothiazolyl, isoxazolidinyl, imidazolidinyl, morpholinyl, pyrrolidinyl, pyrazolyl, pyrazolinyl, furfuryl, thienyl, benzothienyl, benzoxazolyl, benzisoxazolyl, benzothiazolyl, benzoisothiazolyl, benzothiadiazolyl, tetrazolyl, triazolyl, thiadiazolyl, benzimidazolyl, pyrrolinyl, quinuclidinyl, azanorbornyl, isoquinuclidinyl and the like. Nitrogen-containing heterocyclics may be substituted at nitrogen with an oxygen atom. Sulfur-containing heterocyclics may be substituted at sulfur with one or two oxygen atoms. Configurations of heteroatoms which result in unstable heterocyclics are not included within the scope of the definition of "heterocyclic".

As used herein, the term "alkanoyl" refers to groups of the formula alkyl-C(O)O-, wherein the alkyl group is as defined above.

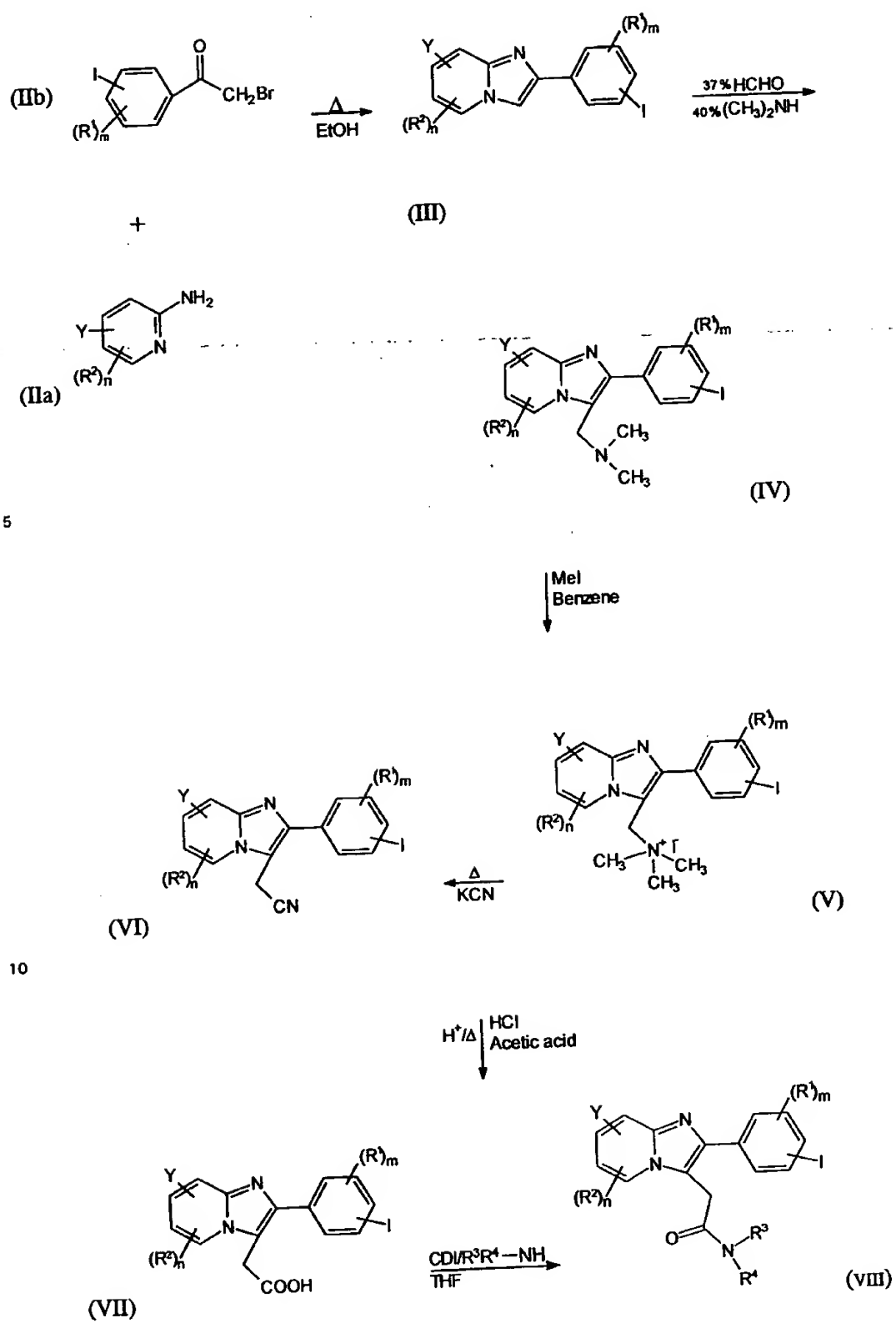
As used herein, the term "acyl" refers to any group of formula QC(O)-, wherein Q is amino, alkylamino, dialkylamino, alkyl, alkoxy, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, 5 arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl and heterocyclic, each of which may be unsubstituted or substituted with from 1 to 3 substituents selected from the group consisting of halogen, OH, (C₁-C₄)alkoxy, SH, NH₂, (C₁-C₄)alkylamino, di((C₁-C₄)-alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₄)alkoxycarbonyl, (C₂-C₄)alkanoyl, oxo, amido, CN, CNS, SCN, CNO, OCN, and NHOH.

10 A compound of the second embodiment may be radiolabelled by any convenient radionuclide. Typically, the radionuclide is an emitter of particles whose energy is suitable for imaging of the emission, or which are suitable in radiation therapy. For example, the radionuclide may be ¹¹C, ¹⁸F, ⁷⁶Br or ¹²³I. Usually, the radionuclide is a radionuclide of iodine, such as ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I or ¹³¹I. For radiotherapy, the radionuclide 15 is typically ¹²³I, ¹²⁵I or ¹³¹I.

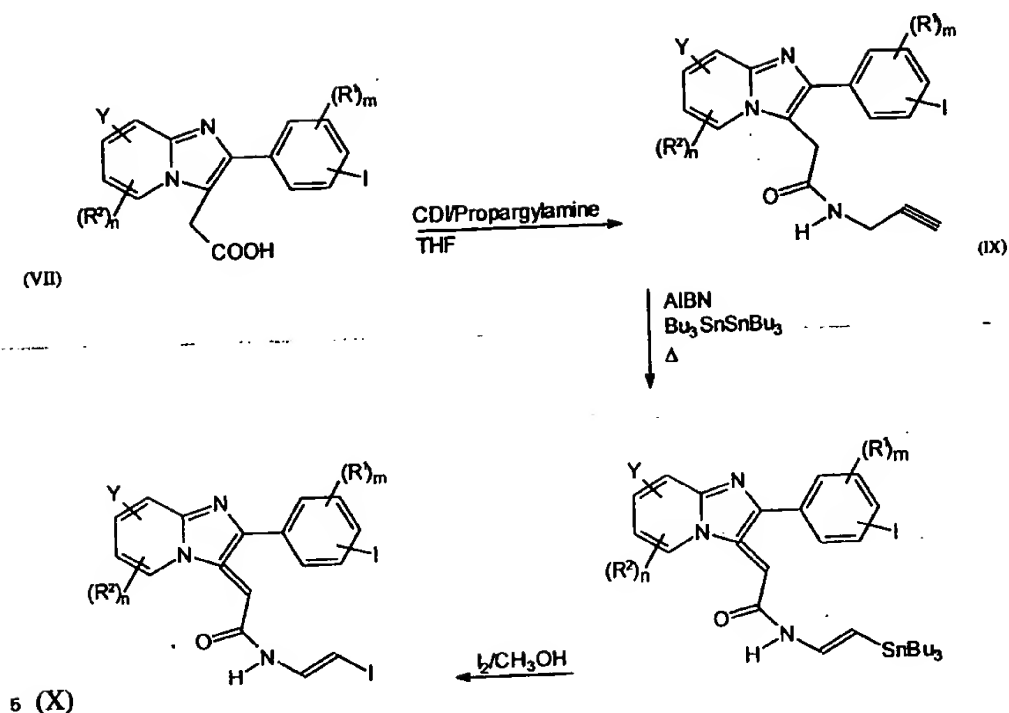
Compounds in accordance with the invention may be synthesised by methods which are generally known in the art. One possible synthesis of imidazo[1,2-a]pyridines in accordance with the present invention is illustrated in Scheme 1.

As shown in Scheme 1, reaction of an α -bromoacetophenone (IIb) with a 2-amino- 20 pyridine (IIa) in ethanol or similar solvent yields an imidazo[1,2-a]pyridine (III). An aminomethyl moiety may be introduced at the 3-position by treatment of the imidazo[1,2-a]pyridine with, for example, dimethylamine and formaldehyde in aqueous medium. The resulting aminomethyl substituent may be demethylated by known methods and acylated to yield compounds of the present invention, or it may be elaborated to an 25 amidomethyl substituent as shown in Scheme 1. Methylation of the aminomethyl group, followed by treatment with potassium cyanide, yields the 3-cyanomethyl imidazo[1,2-a]pyridine (VI), which may be converted to a range of amidomethyl analogs (VIII) by standard methods.

Scheme 2 illustrates a method for preparing N-alkynyl and N-(iodoalkenyl) 30 examples (IX) and (X) respectively, of compound (VIII) from carboxymethyl derivative (VII).



Scheme 1



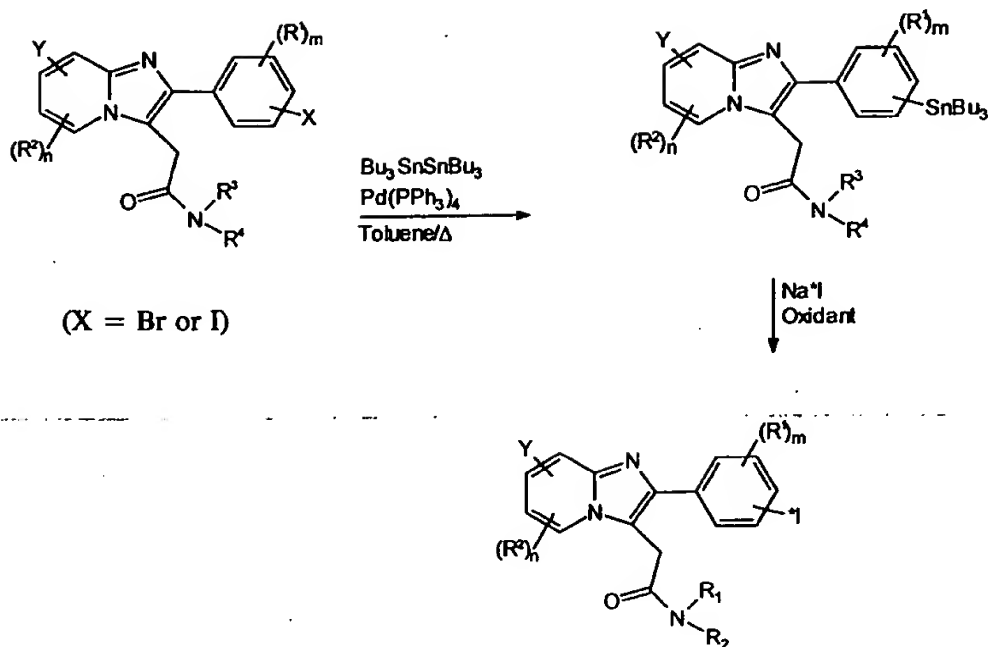
Scheme 2

10

When the radionuclide in a compound of the second embodiment of the invention is a nuclide of iodine, it may conveniently be introduced as the iodo substituent on the 2-phenyl substituent of the imidazo[1,2-a]pyridine, or the substituent Y in the compound of formula (I). A scheme for introducing ^{123}I (or other isotope of iodine, $^*\text{I}$) is illustrated in

15 Scheme 3.

As shown in Scheme 3, starting from a 2-(bromophenyl) or 2-(iodophenyl) imidazo[1,2-a]pyridine (VIII) (a 2-(bromophenyl) compound is shown) the corresponding tributyl stannane is prepared by treating the starting material with tributyltin and palladium tetrakis(triphenylphosphine) in refluxing toluene, dioxane, or toluene/DMF for 20 6-24 hours. The resultant stannanes can be purified by column chromatography and/or by recrystallisation from ethyl acetate/hexane. The radiolabelled iodine analogs are prepared by electrophilic iododestannylation of the tributyltin derivative with Na^*I in the presence of peracetic acid, chloramine-T, iodogen or other oxidising agent in an appropriate solvent such as ethanol/methanol or acetic acid at room temperature.



Scheme 3

Starting materials for synthesis of compounds according to the invention are either commercially available, or are known compounds, or are compounds whose synthesis presents no difficulty to a person of ordinary skill in the relevant art. In some cases, where the presence of a functional group on a substituent of a molecule may interfere with the desired synthetic step such as any of those shown in Schemes 1 to 3, it will be necessary to appropriately protect the functional group. Suitable protecting groups are generally known in the art, and are described, for example, in T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2nd edition, John Wiley & Sons Inc., New York (1991), the disclosure of which is incorporated herein by reference.

A pharmaceutical composition in accordance with the invention may be administered orally, topically, parenterally, e.g. by injection and by intra-arterial infusion, rectally or by inhalation spray.

For oral administration, the pharmaceutical composition may be in the form of tablets, lozenges, pills, troches, capsules, elixirs, powders, granules, suspensions, emulsions, syrups and tinctures. Slow-release, or delayed-release, forms may also be prepared, for example in the form of coated particles, multi-layer tablets or microgranules.

Solid forms for oral administration may contain pharmaceutically acceptable binders, sweeteners, disintegrating agents, diluents, flavourings, coating agents,

preservatives, lubricants and/or time delay agents. Suitable binders include gum acacia, gelatin, corn starch, gum tragacanth, sodium alginate, carboxymethylcellulose or polyethylene glycol. Suitable sweeteners include sucrose, lactose, glucose, aspartame or saccharine. Suitable disintegrating agents include corn starch, methylcellulose, 5 polyvinylpyrrolidone, xanthan gum, bentonite, alginic acid or agar. Suitable diluents include lactose, sorbitol, mannitol, dextrose, kaolin, cellulose, calcium carbonate, calcium silicate or dicalcium phosphate. Suitable flavouring agents include peppermint oil, oil of wintergreen, cherry, orange or raspberry flavouring. Suitable coating agents include polymers or copolymers of acrylic acid and/or methacrylic acid and/or their esters, 10 waxes, fatty alcohols, zein, shellac or gluten. Suitable preservatives include sodium benzoate, vitamin E, alpha-tocopherol, ascorbic acid, methyl paraben, propyl paraben or sodium bisulphite. Suitable lubricants include magnesium stearate, stearic acid, sodium oleate, sodium chloride or talc. Suitable time delay agents include glyceryl monostearate or glyceryl distearate.

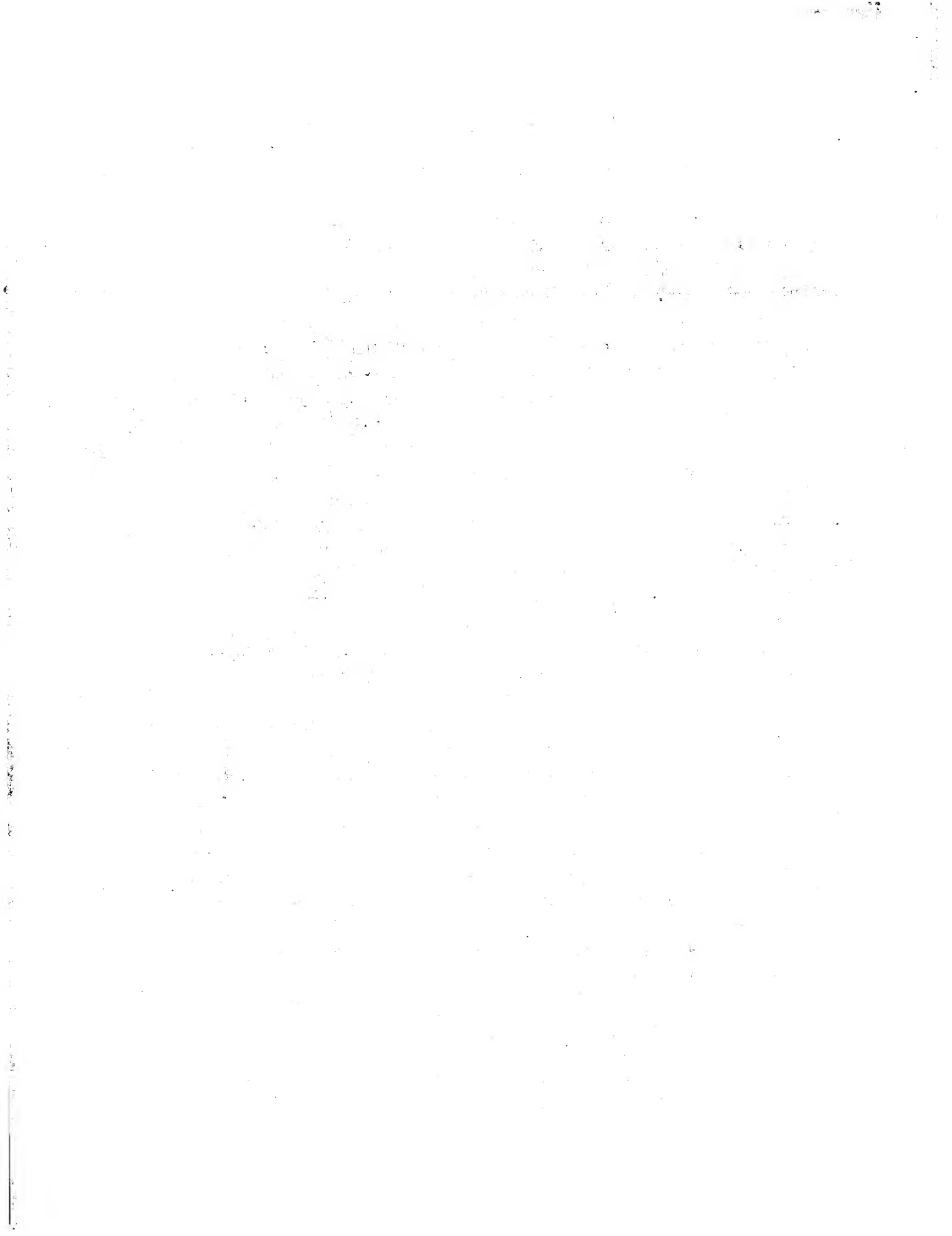
15 Liquid forms for oral administration may contain, in addition to the above agents, a liquid carrier. Suitable liquid carriers include water, oils such as olive oil, peanut oil, sesame oil, sunflower oil, safflower oil, arachis oil, coconut oil, liquid paraffin, ethylene glycol, propylene glycol, polyethylene glycol, ethanol, propanol, isopropanol, glycerol, fatty alcohols, triglycerides or mixtures thereof.

20 Suspensions for oral administration may further comprise dispersing agents and/or suspending agents. Suitable suspending agents include sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, polyvinylpyrrolidone, sodium alginate or cetyl alcohol. Suitable dispersing agents include lecithin, polyoxyethylene esters of fatty acids such as stearic acid, polyoxyethylene sorbitol mono- or di-oleate, -stearate or 25 -laurate, polyoxyethylene sorbitan mono- or di-oleate, -stearate or -laurate and the like.

The emulsions for oral administration may further comprise one or more emulsifying agents. Suitable emulsifying agents include dispersing agents as exemplified above or natural gums such as gum acacia or gum tragacanth.

For topical administration, the pharmaceutical composition may be in the form of a 30 cream, ointment, gel, jelly, tincture, suspension or emulsion. The pharmaceutical composition may contain pharmaceutically acceptable binders, diluents, disintegrating agents, preservatives, lubricants, dispersing agents, suspending agents and/or emulsifying agents as exemplified above.

For parenteral administration, the compound of formula (I) or its salt may be 35 prepared in sterile aqueous or oleaginous solution or suspension. Suitable non-toxic parenterally acceptable diluents or solvents include water, Ringer's solution, isotonic salt solution, 1,3-butanediol, ethanol, propylene glycol or polyethylene glycols in mixtures with water. Aqueous solutions or suspensions may further comprise one or more buffering agents. Suitable buffering agents include sodium acetate, sodium citrate, 40 sodium borate or sodium tartrate, for example.



For rectal administration, the compound of formula (I) is suitably administered in the form of an enema or suppository. A suitable suppository may be prepared by mixing the active substance with a non-irritating excipient which is solid at ordinary temperatures but which will melt in the rectum. Suitable such materials are cocoa butter and polyethylene glycols. Suitable enemas may comprise agents as exemplified above with reference to forms for topical administration.

Suitably, an inhalation spray comprising a compound of formula (I) will be in the form of a solution, suspension or emulsion as exemplified above. The inhalation spray composition may further comprise an inhalable propellant of low toxicity. Suitable propellants include carbon dioxide or nitrous oxide.

Pharmaceutical compositions, diagnostic compositions and medicaments including compounds of the first or the second embodiment may be manufactured by methods which are generally known in the art. Typically such compositions or medicaments are prepared by grinding, crushing, blending, dispersing, dissolving, suspending, mixing, admixing, combining, emulsifying or homogenising a compound of the first or second embodiment with one or more suitable carriers, adjuvants, diluents or excipients. Combinations of two or more of the foregoing steps may also be employed.

The dosage form of the compound of formula (I) will include from 0.01% to 99% by weight of the active substance. Usually, dosage forms according to the invention will comprise from 0.1% to about 10% by weight of the active substance.

In a diagnostic method in accordance with the third embodiment of the invention, a dosage of typically from about 3 to about 25mCi of a compound of the second embodiment is typically administered to a mammal, usually a human, in whom it is desired to diagnose the presence or absence of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors. After a period of from 0.5 to 60 hours following administration of a compound of the second embodiment, more typically from 1 to 40 hours, an image of the distribution of radioactivity in the body, or part of the body, of the mammal is obtained. It will be appreciated that the lower doses are appropriate for administration to a child, and the higher dosages are more appropriate for administration for diagnosis of a tumour where imaging is to be carried out 24 hours or more after administration of the substance. The presence of a concentration of radioactivity at a site where an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors occurs in a mammal suffering from the disorder indicates a positive diagnosis.

A method in accordance with the fourth embodiment includes the administration to a mammal, typically a human, of a compound of the first embodiment. The administered dosage of the compound of formula (I) can vary and depends on several factors, such as the condition of the patient. Dosages will range from 0.01mg to 200 mg per kg. Usually, the dose of the active substance will be from 0.01mg to 10mg per kg of body weight.

In a method in accordance with the fifth embodiment of the present invention involving the administration of a radiolabelled compound of the second embodiment, or a pharmaceutical or diagnostic composition thereof, the dosage administered is typically in the range of from 1-3mCi per kg of body weight of the mammal, or from 10-300mCi, more typically 50-300mCi, per dose. The mammal is typically a human.

A therapeutic or radiotherapeutic dosage of a compound of the first or second embodiment of the invention will be determined by the attending physician in any given circumstance, depending on factors such as the condition which is to be treated in the patient, and its severity.

Conditions for the treatment of which compounds in accordance with the invention are useful are conditions associated with abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors such as neurodegenerative disorders, including Huntington's disease, Alzheimer's disease, anxiety, stress, emotional disturbances, cognitive impairment, stroke, and cerebral ischemia; certain tumours, such as glioma, and carcinoma of the ovary, colon, breast, prostate, brain and adrenals; neurotoxic injury, including that associated with anoxia or ischemia which may result from stroke or cardiac arrest; cognitive disorders, and in cognitive enhancement.

A compound in accordance with the invention may be administered in a single dose, or in two doses, or in multiple doses, depending on the disorder, the stage of the disorder, its response to the treatment, and any undesirable effects which may become apparent.

Best Method and Other Methods for Carrying out the Invention

In one form of the present invention, the compound of formula (I) is a compound wherein p is 1.

In another form of the present invention, the compound of formula (I) is a compound wherein:

Y is selected from F, Cl, Br, I, CN and OH;

Z is selected from $N(R^3)C(O)R^4$ and $C(O)NR^3R^4$;

R^1 and R^2 are independently selected from (C_1-C_3) alkyl, (C_1-C_3) alkoxy, (C_2-C_3) alkenyl, (C_5-C_6) cycloalkyl, phenyl, naphthyl, phenoxy, naphthyloxy, benzyl, pyridyl, furanyl, thienyl, piperidiny, morpholiny, tetrahydrofuranyl, dioxanyl, (C_2-C_4) alkanoyl and (C_2-C_4) acyl, each of which may be unsubstituted or substituted with from a substituent selected from the group consisting of halogen, OH, (C_2-C_4) alkoxy, NH_2 , (C_1-C_3) alkylamino, di $((C_1-C_3)$ alkyl)amino, carboxy, (C_1-C_3) alkoxycarbonyl, (C_2-C_4) alkanoyl, oxo and amido;

R^3 and R^4 are each independently hydrogen or a group selected from (C_1-C_3) alkyl, (C_2-C_3) alkenyl, (C_5-C_6) cycloalkyl, phenyl, naphthyl, benzyl and (C_2-C_4) acyl, each of which may be unsubstituted or substituted with a substituent selected from the group

consisting of halogen, OH, (C₁-C₃)alkoxy, NH₂, (C₁-C₃)alkylamino, di((C₁-C₃)alkyl)-amino, carboxy, (C₁-C₃)alkoxycarbonyl, (C₂-C₄)alkanoyl, oxo and amido,

or R³ and R⁴ together are (C₂-C₃) alkylidene which may be optionally substituted with from a substituent selected from the group consisting of halogen, OH,
5 (C₁-C₃)alkoxy, NH₂, (C₁-C₃)alkylamino, di((C₁-C₃)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₃)alkoxycarbonyl, (C₂-C₄)alkanoyl, oxo and amido;

m and n are independently 0 or 1; and

p is 1.

In yet another form of the present invention, the compound of formula (I) is a
10 compound wherein n is 0.

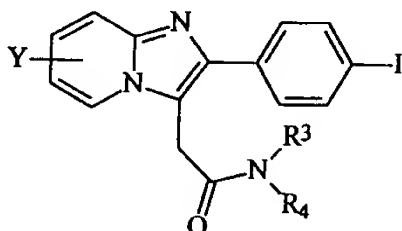
In still another form of the present invention, the compound of formula (I) is a compound wherein p is 1, and n and m are each 0.

In even another form of the present invention, the compound of formula (I) is a compound wherein p is 1, n and m are each 0, and Y is selected from F, Cl, Br, and I.

15 In a further form of the present invention, the compound of formula (I) is a compound wherein p is 1, n and m are each 0, and Y is selected from Cl and Br.

In a still further form of the present invention, the compound of formula (I) is a compound wherein p is 1, n and m are each 0, Y is selected from Cl and Br and Z is C(O)NR¹³R¹⁴, wherein R¹³ and R¹⁴ are independently selected from hydrogen,
20 (C₁-C₄)alkyl and (C₂-C₄)alkenyl, each of which may be substituted with iodine.

In yet a further form of the invention, the compound of formula (I) is a 2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamide derivative of formula (IA)



(IA)

wherein Y is halogen and R³ and R⁴ are independently selected from hydrogen,
25 (C₁-C₄)alkyl and (C₂-C₄)alkenyl, or R³ and R⁴ taken together are (C₂-C₃)alkylidene.

In even a further form of the invention, the compound of formula (I) is a 2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamide derivative of formula (IA), wherein Y is at the 6-position and R³ and R⁴ are independently selected from hydrogen and (C₁-C₄)alkyl.

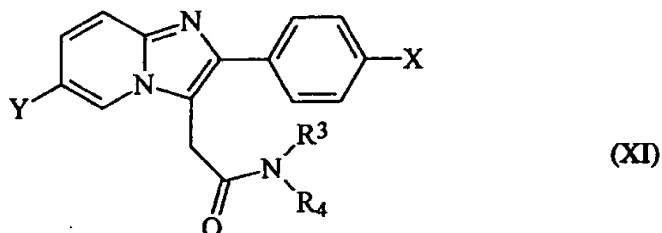
30 In one preferred method of diagnosis of the third embodiment utilising SPECT, the compound in accordance with the invention is radiolabelled with ¹²³I.

In another preferred method of diagnosis of the third embodiment utilising PET, the compound in accordance with the invention is radiolabelled with ¹²⁴I.

In one preferred method of treatment in accordance with the fifth embodiment, the compound in accordance with the invention is radiolabelled with ^{125}I or ^{131}I .

Examples

Examples of specific compounds of formula (I) in accordance with the invention, and representative comparative examples, are compounds of formula (XI) as follows



Example	X	Y	R ³	R ⁴	Melting Point (°C)
1	I	Cl	H	CH ₃	308-310
2	I	Cl	CH ₃	CH ₃	216-218
3	I	Cl	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	178-180
4	I	Cl	CH ₃	C ₃ H ₇	170-172
5	I	Cl	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	152-153
6	I	Cl	CH ₃	C ₄ H ₉	246-248
7	I	Cl	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	250-252
Comparative Example	X	Y	R ¹	R ²	Melting Point (°C)
A	F	Cl	H	H	250-252
B	F	Cl	H	CH ₃	254-256
C	Cl	Br	H	CH ₃	298-300
D	Cl	Br	CH ₃	CH ₃	234-236
E	I	CH ₃	CH ₃	CH ₃	

General synthetic procedure for preparation of imidazo[1,2-a]pyridines in accordance with the invention.

In steps A to F described below there are provided general synthetic procedures for obtaining compounds in accordance with the invention. Identification numerals, such as (III), refer to the identification numerals used in Schemes 1 and 2 above.

A. 2-Phenyl imidazo[1,2-a]pyridines (III)

A mixture of equimolar amounts of an α -bromo-acetophenone and a 2-amino-pyridine are heated to reflux in ethanol for 2 h. After cooling, the mixture is treated with 5% NaHCO₃ and heated to reflux for another 5 h. The mixture is then cooled to room temperature and the resultant suspension of imidazo[1,2-a]pyridine is removed by

filtration. A second crop of the reaction product can be obtained after concentration or extraction of the residue with ethyl acetate. The ethyl acetate extract is washed with a little cold ethanol and water and dried (Na_2SO_4) and the solvent is removed by rotary evaporation.

5 **B. 2-Phenyl-3-dimethylaminomethylimidazo[1,2-a]pyridines (IV)**

To a mixture of the product from step A in acetic acid is added 6 equivalents of 37% aqueous formaldehyde and 1.2 equivalents of 40% aqueous dimethylamine. The mixture is stirred at 55°C for 24 hours and then evaporated to dryness. The residual oil is cooled to ambient temperature and taken up in chloroform. The chloroform layer is washed with
10 2M HCl and the combined aqueous layers made alkaline to pH 12. The resultant precipitate is filtered, washed with water and dried to give a white solid.

C. 3-Dimethylaminomethyl-2-phenyl-imidazo[1,2-a]pyridinyl methiodides (V)

A mixture of the product of step B and about 2.75 equivalents of methyl iodide in benzene is stirred for 72 hours in the dark at room temperature. The resultant white suspension is
15 filtered, washed with ether, and dried to give the methiodide salt. This may be used directly in the next step without further purification.

D. 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetonitriles (VI)

The methiodide salt obtained from step C and 4 equivalents of potassium cyanide are heated to reflux in a 1:1 mixture of ethanol and water for 24 hours. A gentle stream of
20 nitrogen is blown over the reaction mixture to remove part of the solvent and any HCN. The resulting suspension is removed by filtration to give an off white solid.

E. 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetic acids (VII)

A mixture of concentrated hydrochloric acid and acetic acid (1:1) is added to the nitrile obtained in step D and the mixture is heated to reflux for 15-18 hours. After the mixture
25 is cooled to room temperature the solvents are evaporated, the residue is made alkaline with aqueous NaOH, and the resulting solution is filtered. The filtrate is acidified with glacial acetic acid and the product is collected by filtration, washed with water and dried to give a white solid.

F. 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamides (VIII)

30 1.2 equivalents of 1,1'-carbonyl diimidazole is added to a suspension of the acid product of step E in dry tetrahydrofuran (THF) and the resultant mixture is stirred for 1 hour at room temperature and for 1 hour at 50°C. After the mixture is cooled to room temperature it is treated with the desired amine in THF. The mixture is stirred for one hour and the solvent is evaporated. The residue is taken up in dichloromethane and
35 washed with 10% sodium bicarbonate. The aqueous layer is then extracted three times with dichloromethane. The organic layers are combined, dried and evaporated to give the crude product. The products are purified by recrystallisation from a suitable solvent such as dichloromethane, ethyl acetate, ether, ethanol, or mixtures thereof.

G. 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N-(tributylstannyl)propenyl)acetamides

A mixture of the reaction product of step F, having an N-propynyl substituent on the acetamido moiety, about 1.2 equivalents of hexabutylditin and AIBN in dry toluene under nitrogen are heated to reflux for 4-5 hours. The resultant reaction mixture is then put on
5 water and extracted with ethyl acetate. The solvent extract is dried and concentrated under vacuum. Purification of the residue by flash chromatography (ethyl acetate:petroleum spirit 40:60) yields the tri-n-butylstannane as a solid.

H. 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N-iodopropenyl)acetamides (X)

The stannane obtained from step G is dissolved in methanol, an equimolar amount of
10 iodine is added and the mixture is stirred for 2 hours. The resultant reaction mixture is evaporated and dissolved in dichloromethane. The solution is washed with sodium bisulfite solution, dried and evaporated.

By the general procedure of steps A to F described above, the following compounds were prepared.

Example 1 6-chloro-2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N-methyl)acetamide
15 Recrystallised from dichloromethane/ethanol (60-70% yield) m.p. 308-310°C. ¹H-NMR (DMSO) δ 2.64 (d, J=4.58Hz, 3H, NCH₃), 4.00 (s, 2H, CH₂), 7.33 (dd, J=7.8 1.94Hz, J=7.5, 1.94Hz, H7), 7.59 (d, J=8.41Hz, 2H, Ar), 7.64 (d, J=8.7, 9.51Hz, H8), 7.83 (d, J=8.40Hz, 2H, Ar), 8.21-8.23 (m, J=4.41Hz, NH), 8.64 (d, J=1.31Hz, H5). MS
20 (ES) m/z: 428 (M⁺), 427 (M⁺), 426.

Example 2 6-chloro-2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N,N-dimethyl)-acetamide

Recrystallised from dichloromethane (60-70% yield) m.p. 216-218°C. ¹H-NMR (DMSO)
δ 2.90 (s, 3H, NCH₃), 3.14 (s, 3H, NCH₃), 4.24 (s, 2H, CH₂), 7.31 (dd, J=7.8 3.99Hz,
25 J=7.5 3.99Hz, H7), 7.43-7.45 (m, J=8.42Hz, 2H, Ar), 7.64 (d, J=8.7 9.61Hz, H8), 7.83-7.85 (m, J=8.42Hz, 2H, Ar), 8.57-8.58 (m, J=1.92, H5). MS (ES) m/z: 442.5 (M⁺), 441.5 (M⁺), 440.5 (M⁺), 439.5.

Example 3 6-chloro-2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N,N-diethyl)acetamide

Recrystallised from dichloromethane/ethanol (80-90% yield) m.p. 178-180°C. ¹H-NMR
30 (CDCl₃) δ 1.07 (t, J=14.27Hz, 3H, CH₃), 1.14 (t, J=14.25Hz, 3H, CH₃), 2.26-2.30 (m, J=7.16Hz, 2H, NCH₂), 3.38-3.40 (m, J=7.07Hz, 2H, NCH₂), 4.05 (s, 2H, CH₂), 7.17 (dd, J=7.8 1.99Hz, J=7.5 1.93Hz, H7), 7.39-7.41 (m, J=8.42Hz, 2H, Ar), 7.57 (dd, J=8.7 0.71Hz, J=8.5, 0.63Hz, H8), 7.79-7.81 (m, J=8.43Hz, 2H, Ar), 8.24-8.25 (m, J=2.54Hz, H5). MS (ES) m/z: 470.5 (M⁺), 469.5 (M⁺), 468.5 (M⁺), 467.5.

Example 4 6-chloro-2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N-methyl, N-propyl)-acetamide

Recrystallised from dichloromethane (50-60% yield) m.p. 170-172°C. ¹H-NMR (CDCl₃)
δ 0.77-0.91 (m, J=51.31Hz, 3H, CH₃), 1.49-1.59 (m, J=42.54Hz, 2H, CH₂), 2.95 (d, J=5.28Hz, 3H, CH₃), 3.14-3.49 (m, J=100.60Hz, 3H, CH₃), 4.05 (d, J=12.30Hz, 2H,

CH₂), 7.16-7.19 (m, J=12.60Hz, H7), 7.38-7.41 (m, J=11.01Hz, 2H, Ar), 7.57 (d, J=8.7 9.52Hz, H8), 7.79-7.81 (m, J=9.31Hz, 2H, Ar), 8.23 (dd, J=28.60Hz, H5). MS (ES) m/z: 470.5 (M⁺), 469.5 (M⁺), 468.5 (M⁺), 467.5.

Example 5 6-chloro-2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N,N-dipropyl)-

5 **acetamide**

Recrystallised from dichloromethane (80-90% yield) m.p. 152-153°C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0.78 (t, J=14.77Hz, 3H, CH₃), 0.87 (t, J=14.82Hz, 3H, CH₃), 1.50-1.58 (m, J=33.30Hz, 4H, 2CH₂), 3.12-3.16 (m, J=15.67Hz, 2H, CH₂), 3.29-3.33 (m, J=15.23Hz, 2H, CH₂), 4.06 (s, 2H, CH₂), 7.17 (dd, J=7.5 1.96Hz, J=7.8 1.98Hz, H7), 7.39-7.41 (m, J=8.41Hz, 2H, Ar), 7.56 (dd, J=8.5 0.68Hz, J=8.7 0.59Hz, H8), 7.79-7.81 (m, J=8.41Hz, 2H, Ar), 8.26-8.27 (m, J=2.51Hz, H5). MS (ES) m/z: 498.5 (M⁺), 497.5 (M⁺), 496.5 (M⁺), 495.5, 288.

Example 6 6-chloro-2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N-methyl, N-butyl)-
acetamide

15 Recrystallised from dichloromethane (50-60% yield) m.p. 246-248°C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0.74 (t, J=14.58Hz, 3H, CH₃), 1.03-1.09 (m, J=22.53Hz, 2H, CH₂), 1.20-1.27 (m, J=25.32Hz, 2H, CH₂), 2.11 (s, 2H, CH₂), 2.26-2.31 (m, J=15.65Hz, 2H, CH₂), 3.86 (s, 2H, CH₂), 7.13 (dd, J=7.5 1.93Hz, J=7.8 1.95Hz, H7), 7.54 (d, J=8.7 9.52Hz, H8), 7.66-7.68 (m, J=8.44Hz, 2H, Ar), 7.75-7.77 (m, J=8.41Hz, 2H, Ar), 8.25 (d, J=1.59Hz, H5). MS (ES) m/z: 498.5 (M⁺), 497.5 (M⁺), 496.5 (M⁺), 495.5, 288.

Example 7 6-chloro-2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-(N,N-dibutyl)-
acetamide

25 Recrystallised from dichloromethane/ether (60-70% yield) m.p. 250-252°C. ¹H-NMR (DMSO) δ 0.84 (t, J=14.68Hz, 6H, 2CH₃), 1.24-1.30 (m, J=22.39Hz, 4H, 2CH₂), 1.43-1.4, (m, J=23.22Hz, 4H, 2CH₂), 2.70-2.7, (m, J=15.28Hz, 4H, 2CH₂), 3.77 (s, 2H, CH₂), 7.27 (dd, J=7.5 2.04Hz, J=7.8 2.04Hz, H7), 7.60 (dd, J=5.8 0.78Hz, J=8.7 0.71Hz, H8), 7.73-7.75 (m, J=8.50Hz, 2H, Ar), 7.80-7.82 (m, J=8.63Hz, 2H, Ar), 8.65-8.66 (m, J=1.99Hz, H5). MS (ES) m/z: 523.5 (M), 468.5, 467.5, 467.5, 413.5, 412.5, 130.

30 **Radiolabelled derivatives**

Radiolabelled derivatives having an iodine radionuclide at the 4' position may be synthesised as generally illustrated in Scheme 3.

Conversion of tributyltin precursor to radiolabelled 4'-iodophenyl-imidazo[1,2-a]-pyridine-3-acetamide

35 The butyltin precursor (0.1-0.5mg) in acetic acid (200-500μL) is treated with Na¹²³I (or ^{124/125/131}I) solution followed by peracetic acid (100μL). The peracetic acid may be prepared by the addition of hydrogen peroxide (100μL) to acetic acid (500μL), or commercial peracetic acid (0.3-33%) in acetic acid may be used. After 1-10 minutes, the reaction mixture is quenched with Na₂S₂O₅ (200μL, 50mg/mL) and neutralised with
40 NaHCO₃ (200μL, 50mg/mL). The reaction mixture is injected into a semipreparative C-

18 reverse phase HPLC column (Econosil, Alltech Associates) for purification and isolation of the pure product. The mobile phase eluant is typically ethanol/water or acetonitrile/0.1M ammonium acetate at typical flow rates ranging from 2.5-4 mL/minute. The radiochemical yield of the radioiodinated products was 65-85% with the chemical and
5 radiochemical purity exceeding 97%. The specific activity in all cases exceeded 2000Ci/mmol. The solvent is evaporated under reduced pressure and the product residue is reconstituted in an acceptable medium suitable for intravenous injection. This medium may be sterile saline 0.9%. the product is sterile filtered through a 0.22 μ sterile filter.

In vitro binding studies

10 In vitro binding in adrenal and kidney mitochondrial cell membranes showed that the compounds in the present invention bind to a single population of binding sites. In comparison, the in vitro binding to the central benzodiazepine receptor using rat brain homogenates was greater than 100nM.

Methodology

15 In vitro binding assays for peripheral benzodiazepine receptors

Membrane Preparation

Male Sprague Dawley rats are sacrificed by CO₂ administration followed by cervical dislocation. Kidneys are removed and placed in 20 volumes of ice-cold buffer (50nM Tris-HCl, pH 7.4) and minced finely with scissors. After homogenising the preparation
20 with a polytron (PCU Kinematica, Bioblock, Switzerland) with one 10-second burst at a setting of 10, the suspension is centrifuged at 49,000g for 15 minutes at 4°C. The pellets are resuspended in the previous buffer with a dounce (manual homogeniser) to yield an appropriate protein concentration. Protein measurements are made by Lowry's method using bovine serum albumin as standard.

25 In vitro binding assay

The inhibition constant of the test compound (IC₅₀) is determined by incubating aliquots (0.1mL), in triplicate, of diluted kidney membrane preparation at 4°C for 1 hour with 7 concentrations of test compound (10⁻⁶ to 10⁻¹⁰M), together with a trace amount (2nM) of [³H]-PK11195 in a final volume of 0.5mL. Non-specific binding is determined
30 by blocking with cold PK11195 (10 μ M). Incubation is terminated by rapid filtration through Whatman GF/B glass fiber. Each sample tube and filter is immediately washed with 3 aliquots of 5mL ice-cold 50nM Tris/HCl at pH 7.4. Filters are counted with a β -scintillation counter (Packard) to measure the amount of bound radioactivity. Ki and IC₅₀ are calculated by EBDA/Ligand, iterative non-linear least squares curve-fitting programs
35 (G. A. McPherson, *J. Pharmacol. Methods* 14, 213-228 (1985)).

In vitro binding assays for central benzodiazepine receptors

Membrane Preparation

Male Sprague Dawley rats are sacrificed by CO₂ administration followed by cervical dislocation. Cortex is removed and placed in 20 volumes of ice-cold buffer (50nM Tris-

HCl, pH 7.4) and minced finely with scissors. After homogenising the preparation with a polytron (PCU Kinematica, Bioblock, Switzerland) with one 10-second burst at a setting of 6, the suspension is centrifuged at 20,000g for 20 minutes at 4°C. The pellets are resuspended in the previous buffer with a dounce (manual homogeniser). After the
 5 second centrifugation, the pellet is suspended in a final buffer (50nM Tris-HCl, 0.32M sucrose, pH 7.4) to yield an appropriate protein concentration. Protein measurements are made by Lowry's method using bovine serum albumin as standard.

In vitro binding assay

The inhibition constant of the test compound (IC_{50}) is determined by incubating
 10 aliquots (0.1mL), in triplicate, of diluted cortex membrane preparation at 25°C for 45 minutes with 7 concentrations of test compound (10^{-6} to 10^{-10} M), together with a trace amount (2nM) of [3 H]-Ro 15-1788 in a final volume of 0.5mL. Non-specific binding is determined by blocking with cold Flumazenil (20 μ M). Incubation is terminated by rapid filtration through Whatman GF/B glass fiber. Each sample tube and filter is immediately
 15 washed with 3 aliquots of 5mL ice-cold 50nM Tris/HCl at pH 7.4. Filters are counted with a β -scintillation counter (Packard) to measure the amount of bound radioactivity. K_i and IC_{50} are calculated by EBDA/Ligand, iterative non-linear least squares curve-fitting programs (G. A. McPherson, *J. Pharmacol. Methods* 14, 213-228 (1985)).

Table 1 provides comparative in vitro binding IC_{50} values for compounds of the
 20 present invention and for representative comparative compounds, including prior art compounds

Table 1

Example	IC_{50} (nM)	
	PBR*	CBR**
1	0.99	> 1000
2	2.30	168
3	<0.01	> 1000
4	0.98	117
5	3.91	> 1000
6	266	> 1000
7	177	> 1000
Comparative Example		
A	3340	170
B	> 1000	5.9
C	33	15
D	90	56.5
E	176	155

* peripheral benzodiazepine receptor

** central benzodiazepine receptor

In vivo biodistribution studies

In vivo biodistribution of radiolabelled compounds of the invention indicated high uptake in the tissues which have known PBR sites. Tables 2 to 4 show the biodistribution of the compounds of Examples 1-3, in which the iodine atom is radiolabelled, when
5 administered to rats.

Pretreatment of the rats with known standards such as PK 11195 as well as the compound of Examples 1-7 without radiolabel (1 mg/kg) significantly reduced the uptake of activity in the tissues of interest. Pretreatment with Diazepam and Flumazenil and other central acting benzodiazepines reduced the uptake of activity of the radiolabelled
10 compounds of the invention only marginally, indicating that the binding of the compounds of the invention in vivo is specific and selective for the peripheral benzodiazepine receptors.

Table 2: Biodistribution of ¹²³I Example 1 (%ID/g organ) in rats

Time (Min)	Liver	Kidney	Lungs	Heart	Blood	Brain	Olfactive bulbs	Adrenals	Testes
5	0.94±0.12	1.8±0.35	2.81±0.49	3.25±0.58	0.25±0.04	0.11±0.02	0.2±0.02	4.51±1.32	0.14±0.03
15	0.7±0.07	1.66±0.13	1.79±0.18	2.09±0.09	0.16±0.01	0.08±0.01	0.18±0.03	7.8±2.16	0.22±0.06
30	0.59±0.04	1.25±0.09	1.39±0.14	1.41±0.14	0.12±0.01	0.06±0.01	0.13±0.02	11±2.57	0.26±0.05
60	0.47±0.02	0.97±0.07	0.97±0.22	1.07±0.09	0.1±0.01	0.04±0.001	0.14±0.001	11.3±0.87	0.28±0.05
180	0.37±0.01	0.61±0.02	0.72±0.05	0.68±0.09	0.07±0.001	0.03±0.001	0.09±0.02	9.84±1.69	0.25±0.01
240	0.33±0.04	0.5±0.07	0.63±0.05	0.54±0.05	0.06±0.01	0.02±0.01	0.07±0.001	6.78±1.27	0.22±0.03
360	0.27±0.01	0.36±0.01	0.44±0.07	0.38±0.02	0.05±0.001	0.02±0.001	0.05±0.001	5.7±0.15	0.16±0.03
24Hrs	0.09±0.01	0.03±0.001	0.02±0.001	0.02±0.001	0.01±0.001	0	0.01±0.001	0.22±0.09	0.01±0.001

Table 3: Biodistribution of ¹²³I Example 2 (%ID/g organ) in rats

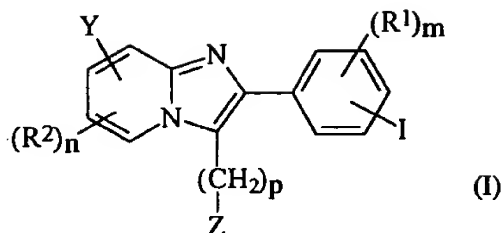
Time (Min)	Liver	Kidney	Lungs	Heart	Blood	Brain	Olfactive bulbs	Adrenals	Testes
5	0.96±0.07	1.62±0.11	2.42±0.26	2.72±0.05	0.2±0.01	0.16±0.001	0.26±0.04	0.4±0.32	0.16±0.02
15	1.15±0.14	1.45±0.02	1.56±0.11	1.73±0.02	0.14±0.01	0.11±0.01	0.22±0.02	5.58±0.86	0.25±0.02
30	0.72±0.06	1.03±0.07	1.05±0.16	1.17±0.06	0.1±0.01	0.07±0.001	0.18±0.001	7.44±1.65	0.3±0.02
60	0.54±0.03	0.66±0.05	0.74±0.06	0.75±0.07	0.08±0.001	0.04±0.001	0.13±0.03	9.38±2.04	0.28±0.05
180	0.26±0.05	0.26±0.03	0.32±0.06	0.26±0.04	0.04±0.001	0.02±0.001	0.05±0.001	4.8±0.85	0.12±0.02
240	0.22±0.04	0.19±0.03	0.21±0.02	0.18±0.03	0.04±0.01	0.01±0.001	0.04±0.001	3.27±0.77	0.08±0.01
360	0.11±0.01	0.09±0.02	0.11±0.03	0.09±0.03	0.02±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	1.17±0.45	0.04±0.01
24hrs	0.03±0.01	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001	0	0	0	0.04±0.001	0

Table 4: Biodistribution of ^{123}I Example 3 (%ID/g organ) in rats

Time (Min)	Liver	Kidney	Lungs	Heart	Blood	Brain	Olfactive bulbs	Adrenals
5	0.87±0.13	1.73±0.38	13.16±1.24	2.63±0.30	0.46±0.08	0.33±0.04	0.44±0.08	2.11±0.12
15	0.93±0.06	2.11±0.31	6.98±1.87	2.39±0.35	0.16±0.02	0.2±0.02	0.31±0.03	2.03±0.8
30	0.76±0.01	2.31±0.02	4.91±0.22	2.44±0.28	0.12±0.03	0.15±0.01	0.26±0.03	2.42±0.36
60	0.41±0.14	1.87±0.56	2.76±0.80	2.65±0.63	0.06±0.02	0.08±0.02	0.2±0.07	2.83±0.41
180	0.28±0.02	1.71±0.17	1.63±0.07	2.59±0.16	0.04±0.001	0.05±0.001	0.16±0.02	4.1±0.80
240	0.23±0.03	1.37±0.18	1.38±0.09	2.49±0.22	0.05±0.001	0.05±0.01	0.18±0.03	4.32±0.60
360	0.23±0.02	1.43±0.25	1.21±0.27	2.13±0.45	0.04±0.001	0.05±0.02	0.18±0.04	5.28±0.95
480	0.16±0.01	0.87±0.15	0.75±0.07	1.48±0.12	0.03±0.001	0.03±0.001	0.16±0.03	4.22±0.12
24Hrs	0.06±0.001	0.25±0.03	0.31±0.06	0.39±0.03	0.02±0.001	0.01±0.001	0.09±0.001	4.56±0.74
48Hrs	0.04±0.001	0.12±0.01	0.17±0.02	0.17±0.02	0.01±0.001	0.01±0.001	0.07±0.001	4.87±0.55

Claims

1. A compound of formula (I)



wherein

Y is selected from F, Cl, Br, I, OH, SH, NH₂, CN, and COOH;

Z is selected from N(R³)C(O)R⁴ and C(O)NR³R⁴;

R¹ and R² are independently selected from (C₁-C₆)alkyl, (C₁-C₆)alkoxy, (C₂-C₆)alkenyl, (C₂-C₆)alkynyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, (C₆-C₁₂)aryl, (C₆-C₁₂)aryloxy, (C₆-C₁₂)aryl(C₁-C₆)alkyl, heteroaryl, heteroaryl(C₁-C₆)alkyl, heterocyclic, (C₂-C₆)alkanoyl and (C₂-C₇)acyl, each of which may be unsubstituted or substituted with from 1 to 3 substituents selected from the group consisting of halogen, OH, (C₁-C₄)alkoxy, SH, NH₂, (C₁-C₄)alkylamino, di((C₁-C₄)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₄)alkoxycarbonyl, (C₂-C₄)alkanoyl, oxo, amido, CN, CNS, SCN, CNO, OCN, and NHOH;

R³ and R⁴ are each independently hydrogen or a group selected from (C₁-C₄)alkyl, (C₂-C₄)alkenyl, (C₂-C₄)alkynyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, (C₆-C₁₂)aryl, (C₆-C₁₂)aryl(C₁-C₄)alkyl, heteroaryl, heteroaryl(C₁-C₄)alkyl, heterocyclic, (C₁-C₄)alkoxycarbonyl and (C₂-C₅)acyl, each of which may be unsubstituted or substituted with from 1 to 3 substituents selected from the group consisting of halogen, OH, (C₁-C₄)alkoxy, SH, NH₂, (C₁-C₄)alkylamino, di((C₁-C₄)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₄)alkoxycarbonyl, (C₁-C₄)alkanoyl, oxo, amido, CN, CNS, SCN, CNO, OCN, and NHOH,

or R³ and R⁴ together are (C₂-C₇) alkylidene which may be optionally substituted with from 1 to 3 substituents selected from the group consisting of halogen, OH, (C₁-C₄)alkoxy, SH, NH₂, (C₁-C₄)alkylamino, di((C₁-C₄)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₄)alkoxycarbonyl, (C₁-C₄)alkanoyl, oxo, amido, CN, CNS, SCN, CNO, OCN, and NHOH;

m and n are independently 0, 1 or 2; and

p is an integer from 1 to 4.

2. A compound according to claim 1 wherein n is 0.

3. A compound according to claim 1 wherein p is 1.

4. A compound according to claim 1 wherein:

Y is selected from F, Cl, Br, I, CN and OH;

Z is selected from N(R³)C(O)R⁴ and C(O)NR³R⁴;

R¹ and R² are independently selected from (C₁-C₃)alkyl, (C₁-C₃)alkoxy, (C₂-C₃)alkenyl, (C₅-C₆)cycloalkyl, phenyl, naphthyl, phenoxy, naphthyloxy, benzyl, pyridyl, furanyl, thienyl, piperidinyl, morpholinyl, tetrahydrofuranyl, dioxanyl,

(C₂-C₄)alkanoyl and (C₂-C₄)acyl, each of which may be unsubstituted or substituted with from a substituent selected from the group consisting of halogen, OH, (C₂-C₄)alkoxy, NH₂, (C₁-C₃)alkylamino, di((C₁-C₃)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₃)alkoxycarbonyl, (C₂-C₄)alkanoyl, oxo and amido;

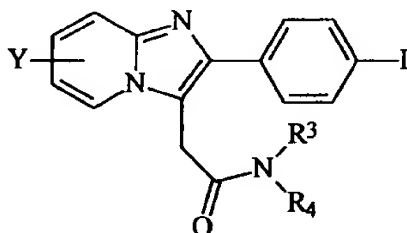
R³ and R⁴ are each independently hydrogen or a group selected from (C₁-C₃)alkyl, (C₂-C₃)alkenyl, (C₅-C₆)cycloalkyl, phenyl, naphthyl, benzyl and (C₂-C₄)acyl, each of which may be unsubstituted or substituted with a substituent selected from the group consisting of halogen, OH, (C₁-C₃)alkoxy, NH₂, (C₁-C₃)alkylamino, di((C₁-C₃)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₃)alkoxycarbonyl, (C₂-C₄)alkanoyl, oxo and amido,

...or R³ and R⁴ together are (C₂-C₃) alkylidene which may be optionally substituted with from a substituent selected from the group consisting of halogen, OH, (C₁-C₃)alkoxy, NH₂, (C₁-C₃)alkylamino, di((C₁-C₃)alkyl)amino, carboxy, (C₁-C₃)alkoxycarbonyl, (C₂-C₄)alkanoyl, oxo and amido;

m and n are independently 0 or 1; and

p is 1.

5. A compound according to claim 1 wherein p is 1, and n and m are each 0.
6. A compound according to claim 1 wherein p is 1, n and m are each 0, and Y is selected from F, Cl, Br, and I.
7. A compound according to claim 6 wherein Y is selected from Cl and Br.
8. A compound according to claim 6 wherein Y is selected from Cl and Br and Z is C(O)NR¹³R¹⁴, wherein R¹³ and R¹⁴ are independently selected from hydrogen, (C₁-C₄)alkyl and (C₂-C₄)alkenyl, each of which may be substituted with iodine.
9. A compound of formula (I) which is a 2-(4'-iodophenyl)-imidazo[1,2-a]pyridine-3-acetamide derivative of formula (IA)



(IA)

wherein Y is halogen and R³ and R⁴ are independently selected from hydrogen, (C₁-C₄)alkyl and (C₂-C₄)alkenyl, or R³ and R⁴ taken together are (C₂-C₃)alkylidene.

10. A compound according to claim 9 wherein Y is at the 6-position and R³ and R⁴ are independently selected from hydrogen and (C₁-C₄)alkyl.
11. A compound according to any one of claims 1-10 which is radiolabelled.
12. A pharmaceutical composition including a compound according to any one of claims 1-10 together with at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent, excipient or adjuvant.

13. A pharmaceutical composition including a compound according to claim 11 together with at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent, excipient or adjuvant.

14. A method for diagnosis of a disorder in a mammal characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors, the method including the steps of:

administering to the mammal an amount of a radiolabelled according to claim 11 sufficient to allow a detectable image of the location of the radiolabel in the body of the mammal to be recorded;

recording a image of the distribution of the radiolabel in at least part of the body of the mammal; and

diagnosing the presence or absence of the disorder from the image.

15. A method for the treatment of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said treatment, the method including administering to the mammal an effective amount of a according to any one of claims 1-10 or a pharmaceutical composition according to claim 12.

16. A method for the radiotherapy of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said radiotherapy, the method including administering to the mammal an effective amount of a compound according to claim 11, or a pharmaceutical composition according to claim 13.

17. Use of a compound according to claim 11 for the manufacture of a diagnostic composition for the diagnosis of a disorder in a mammal characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors.

18. Use of a compound according to any one of claims 1-10 for the manufacture of a medicament for the treatment of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said treatment.

19. Use of a compound according to claim 11 for the manufacture of a medicament for the radiotherapy of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said radiotherapy.

20. A compound according to claim 11 when used in a method according to claim 14.

21. A compound according to any one of claims 1-10 when used in a method for the treatment of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said treatment.

22. A compound according to claim 11 when used in a method for the radiotherapy of a disorder characterised by an abnormal density of peripheral benzodiazepine receptors in a mammal in need of said radiotherapy.

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 7/00	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28947
		(43) Date de publication internationale: 25 mai 2000 (25.05.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02761

(22) Date de dépôt international: 10 novembre 1999 (10.11.99)

(30) Données relatives à la priorité:
98/14387 17 novembre 1998 (17.11.98) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):
SANOFI-SYNTHELABO [FR/FR]; 174, avenue de
France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CASELLAS, Pierre
[FR/FR]; 10, rue Carl Von Linne, La Colombe, F-34090
Montpellier (FR). DEROCCQ, Jean-Marie [FR/FR]; 6, rue
des Clauzes, F-34570 Murviel les Montpellier (FR).

(74) Mandataire: THOURET-LEMAITRE, Elisabeth;
Sanofi-Synthelabo, Service Brevets, 174, avenue de
France, F-75013 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS,
MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

*Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès
réception de ce rapport.*

(54) Title: USE OF A SUBSTANCE BINDING WITH THE PERIPHERAL BENZODIAZEPIN RECEPTOR FOR TREATING SKIN STRESS

(54) Titre: UTILISATION D'UNE SUBSTANCE SE LIANT AU RECEPTEUR PERIPHERIQUE DES BENZODIAZEPINES DANS LE TRAITEMENT DES STRESS CUTANES

(57) Abstract

The invention concerns the use of a substance specifically binding with the peripheral benzodiazepin receptor (PBR) for making a composition for preventing or treating skin stress. The invention also concerns compositions containing said substances. Said compositions can be cosmetic or pharmaceutical, in particular for topical use in dermatology.

(57) Abrégé

La présente invention concerne l'utilisation d'une substance se liant spécifiquement au récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) pour la fabrication d'une composition pour la prophylaxie ou le traitement des stress cutanés. L'invention concerne également les compositions contenant ces substances. Ces compositions peuvent être cosmétiques ou pharmaceutiques, en particulier dermatologiques topiques.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION D'UNE SUBSTANCE SE LIANT AU RECEPTEUR PERIPHERIQUE DES BENZODIAZEPINES DANS LE TRAITEMENT DES STRESS CUTANES.

La présente invention concerne une composition contenant un ligand des récepteurs périphériques des benzodiazépines pour une utilisation par voie topique.

5 L'invention concerne l'utilisation d'une substance se liant spécifiquement au récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) pour la fabrication d'une composition pour la prophylaxie ou le traitement des stress cutanés.

10 L'invention concerne également les compositions contenant ces substances. Ces compositions peuvent être cosmétiques ou pharmaceutiques, en particulier dermatologiques topiques.

Par stress cutané, on entend les différentes situations qui pourraient provoquer des dommages en particulier au niveau de l'épiderme quelque soit l'agent le provoquant. Cet agent peut être interne et/ou externe à l'organisme comme un agent chimique ou radicalaire ou bien externe comme un rayonnement ultraviolet.

15 La composition selon l'invention est donc destinée à prévenir et à lutter contre les irritations cutanées, les dartres, les érythèmes, les sensations dysesthésiques, les sensations d'échauffement, les prurits de la peau et/ou des muqueuses, le vieillissement et peut aussi être utilisée dans les désordres cutanés tels que, par exemple, le psoriasis, les maladies prurigineuses, l'herpès, les photodermatoses, les dermatites atopiques, les dermatites de contact, les lichens, les prurigos, les prurits, les piqures d'insectes, dans les fibroses et autres troubles de la maturation des collagènes, dans les désordres immunologiques ou encore dans des affections dermatologiques comme l'eczéma.

20 Le ligand PBR, également appelé "substance", contenu dans la composition peut-être un composé non peptidique, un peptide, un extrait de cellules ou de tissus d'origine animale ou végétale ou un produit obtenu par fermentation d'un micro-organisme, par exemple d'une bactérie ou d'un champignon.

25 De nombreux ligands PBR sont décrits dans la littérature. On peut citer, à titre d'exemple, le Ro 5-4864 ou chlorodiazépam, le Ro 5-2807 ou diazépam, le PK 11195 ou on pourra se référer à l'article Peripheral Benzodiazepine Receptors, Ch. III, J. J. Bourguignon, Ed. E. Giesen - Crouse, Academic Press.

30 Le PBR est une protéine de 18 KD située sur la membrane externe des mitochondries des tissus périphériques. Il est constitué de cinq domaines transmembranaires et d'une partie carboxyterminale dirigée vers le cytosol. Plusieurs fonctions sont attribuées au PBR selon la nature du tissu considéré : régulation de la stéroïdogénèse, biosynthèse de l'hème, différenciation et croissance cellulaire,

35

contrôle de la respiration mitochondriale (Krueger KE, Biochimica and Biophysica Acta 1995, 1241, 453-470). Bien que sa fonction précise n'ait pas encore été complètement élucidée, plusieurs données expérimentales récentes suggèrent que PBR pourrait jouer un rôle fondamental dans la régulation des processus de mort cellulaire programmée et dans la protection anti-radicalaire.

Il a été montré que PBR est en effet étroitement associé au niveau de la mitochondrie avec des protéines régulatrices de l'apoptose telles que Bcl2 qui prévient la rupture du potentiel de membrane mitochondriale empêchant ainsi l'apoptose induite notamment par la production de radicaux oxygénés réactifs (Marchetti P. *et al*, J. Exp. Med. 1996, 184, 1155-1160) ; (Marchetti P. *et al*, J. Immunol. 1996, 157, 4830-4836).

Dans le cadre de la présente invention, le rôle protecteur anti-radicalaire de PBR a été directement observé sur des cellules d'origine hématopoïétique pour lesquelles une corrélation étroite entre la densité de PBR et la protection anti-radicalaire a été mise en évidence. De plus, dans cette même étude, il a été démontré que la transfection de PBR sur des cellules dépourvues de ce récepteur confère une protection contre les dommages causés par des espèces oxygénées (Carayon P. *et al*, Blood 1996, 87, 3170-3178).

Plusieurs données de la littérature indiquent que PBR jouerait un rôle important dans la régulation des processus apoptotiques et la protection des cellules *vis-à-vis* des dommages causés par les radicaux libres.

Des études phylogéniques récentes renforcent cette nouvelle notion que PBR agit en tant que modulateur d'apoptose impliqué dans des fonctions antioxydantes. Des similarités significatives existent en effet entre PBR et la protéine CrtK de *Rhodobacter sphaeroides*, une bactérie photosynthétique. Cette protéine bactérienne qui fonctionne comme un détecteur d'oxygène photosensible, régule l'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse en réponse à des modifications environnementales de la tension en oxygène et de l'intensité lumineuse. La comparaison entre PBR et CrtK révèle une identité de 35 % et une conservation de séquence entre ces deux protéines qui ont divergé dans la phylogénie il y a deux milliards d'années. Cette homologie suggère une fonction hautement spécialisée et conservée de PBR qui semble similaire à celle de CrtK dans la bactérie. En effet, il a été démontré récemment que le PBR de mammifère transfecté chez des mutants *Rhodobacter* CrtK complémente la fonction détecteur d'oxygène de CrTK. Ainsi, cette étude suggère un rôle clé de PBR dans la transduction des signaux dépendant de l'oxygène (Yeliseev AA., *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1997, 94, 5101-5106).

Cependant, à ce jour, aucune substance n'a jamais été précisément indiquée comme ligand spécifique des récepteurs PBR cutanés.

A plus forte raison, aucune substance active par voie topique et se liant spécifiquement aux récepteurs PBR n'a jamais été décrite dans la littérature.

5 Il a été maintenant montré, dans le cadre de la présente invention, que PBR est abondamment exprimé au niveau de la peau sur les différents compartiments cellulaires qui la composent : kératinocytes, cellules de Langerhans, follicules pileux et cellules endothéliales de la vasculature dermique. Au niveau de la peau, l'expression de PBR suit un gradient croissant de la couche basale vers la couche cornée. Cette
10 organisation remarquable qui privilégie les cellules différenciées de l'épiderme les plus exposées aux stress externes revêt sans doute une signification physiologique de première importance pour la protection des zones de l'épiderme les plus vulnérables. Les études subcellulaires réalisées en microscopie confocale indiquent comme attendu une colocalisation de PBR avec Bcl2 au niveau de la mitochondrie. Les études
15 histologiques sur coupe de peau ont permis de mettre en évidence une répartition surprenante de PBR (Figures 1 et 2).

En effet, l'expression de ce récepteur au niveau de l'épiderme suit un gradient de densité croissant des couches basales vers les couches les plus différenciées de
20 kératinocytes. Cette distribution spatiale très organisée qui privilégie en terme de densité les cellules de l'épiderme les plus externes et donc les plus exposées, laisse supposer que PBR au niveau de la peau pourrait représenter un système de protection naturelle contre les radicaux libres générés par l'exposition aux rayonnements ultraviolets. L'observation concomitante que la distribution de la protéine antiapoptotique Bcl2 obéit à un gradient strictement inverse suggère un rôle
25 compensatoire de PBR pour la préservation des cellules les plus différenciées.

L'ensemble de ces données qui suggèrent une fonction protectrice du PBR, plus particulièrement au niveau de l'épiderme, a conduit à la mise en évidence de ligands naturels ou de synthèse montrant que leur interaction avec PBR pouvait être
30 bénéfique dans différentes situations de stress cutané provoqué par des agents chimiques ou radicalaires ou encore consécutifs à une exposition UV.

Ainsi, selon l'un de ses aspects, la présente invention concerne l'utilisation d'un ligand spécifique du PBR, le Ro 5-4864 dans les stress cutanés. Ce ligand est un agoniste du PBR.

Selon un autre aspect de l'invention et sur la base de ces observations, un screening
35 visant à rechercher des ligands naturels de PBR a été entrepris et a permis d'isoler plusieurs fractions capables d'interagir avec ce récepteur. L'effet potentiellement

protecteur de ces ligands naturels a ensuite été évalué dans différents tests induisant un stress cutané et notamment des tests d'érythèmes cutanés induits par irradiations UV. Les propriétés anti-radicalaires ainsi que les capacités de réparation cutanée ont également été recherchées.

5 Des essais biochimiques et pharmacologiques ont été utilisés pour mettre en évidence l'activité et l'intérêt des substances dans divers stress cutanés.

Les essais réalisés avec PBR ont pour but de montrer son implication potentielle dans la régulation des processus apoptotiques et la préservation des cellules cutanées vis-à-vis de différents stress délétères.

10

EXEMPLE 1

Eudes immuno-histologiques de localisation de PBR au niveau cutané

A l'aide de l'anticorps spécifique anti-PBR, Ac 8D7 (mAb de souris anti-PBR, isotype IgG1, Dussossoy *et al.*, Cytometry, 1996, 24:39-48), une analyse par Western Blot a
15 permis de mettre en évidence la présence abondante de PBR sur six lignées différentes de kératinocytes humains ainsi que sur la peau humaine normale (Figure 1). Au niveau subcellulaire, les analyses réalisées en microscopie confocale confirment sur les kératinocytes une colocalisation de PBR au niveau mitochondrial (Figure 2).

20 Une étude immuno-histologique réalisée sur une coupe d'épiderme humain normal à l'aide du même anticorps révèle un ordonnancement très particulier puisque l'expression de PBR augmente du *stratum basale* vers le *stratum corneum*. Ce récepteur est donc abondamment présent sur les kératinocytes les plus différenciés situés directement sous le *stratum corneum* (Figure 3).

25

EXEMPLE 2

Etudes de liaison et de spécificité

Les études de liaison ou binding ont été réalisées sur la lignée de kératinocytes A-431 (carcinome épidermoïde humain (ATCC, CRL-1555)) par déplacement du ligand de
30 référence [³H]-PK11195. L'analyse de Scatchard indique un seul site de fixation, une densité d'environ 470.000 récepteurs par cellule et une forte affinité du ligand (KD = 1,5 nM) (Figure 4). La spécificité du binding sur le récepteur périphérique porté par les kératinocytes est attestée par les études pharmacologiques qui montrent une efficacité décroissante du déplacement du ligand périphérique de référence (PK 11195) par les
35 ligands suivants :

Ro 5-4864 = ($CI_{50} \approx 25$ nM) > diazepam ($CI_{50} \approx 100$ nM) >>> clonazepam (inactif à 3200 nM). Il est rappelé que ce dernier est un ligand du récepteur central des benzodiazépines, le diazepam est mixte, le Ro 5-4864 est spécifique du PBR (Figure 5).

5

EXEMPLE 3

Implication du PBR dans la protection contre les radicaux oxygénés

Deux types d'expériences sont décrites à la Figure 6. La première a consisté à comparer différentes lignées d'origine lymphoïde ou myéloïde pour leur capacité à résister à la toxicité des radicaux oxygénés en relation avec leur niveau d'expression de PBR. Les résultats indiquent une très forte corrélation entre le nombre de sites PBR par cellule et la résistance à la toxicité induite par l' H_2O_2 . Il existe également une corrélation similaire lorsque l'on considère cette fois le niveau d'expression de Bcl2, protéine connue pour protéger les cellules des dommages oxydatifs. Cette donnée, jointe au fait que Bcl2 et PBR sont deux protéines localisées sur la membrane externe des mitochondries, suggère qu'elles pourraient présenter des fonctions communes dans la protection cellulaire. De façon intéressante, alors que l'expression de PBR suit un gradient de densité croissant de la couche basale vers la limite de la couche cornée, les données de la littérature indiquent un phénomène inverse pour l'expression de Bcl2, suggérant qu'au cours de la différenciation des kératinocytes, PBR pourrait prendre le "relais" de Bcl2 en ce qui concerne les fonctions de protection anti-radicalaire.

Dans la deuxième expérience, le rôle possible de PBR dans la protection *vis-à-vis* de la toxicité des radicaux libres est renforcé par la démonstration de la meilleure viabilité, en présence d' H_2O_2 , de cellules Jurkat transfectées PBR+ en comparaison avec des cellules homologues PBR-.

EXEMPLE 4

L'activité anti-apoptotique des actifs a été mesurée sur des kératinocytes humains et des fibroblastes (ATCC) qui ont été ensemencés dans des boîtes de Pétri de 35 mm (5×10^5 cellules/puits) dans le DMEM (Dubelco's Mode Eagle Medium) additionné de 10 % de sérum de veau foetal et laisser proliférer jusqu'à confluence. Ce milieu de culture est ensuite aspiré, les cellules sont rincées et 0,1 % de sérum de veau foetal est ajouté en présence d'une solution saline. Des concentrations croissantes de la substance à étudier sont additionnées. Vingt quatre heures plus tard, l'apoptose est mesurée avec une trousse de dosage ELISA (de l'anglais "enzyme-linked

immunosorbent assay").

Des kératinocytes ont été soumis à des rayonnements ultraviolets de type B (UVB) à la dose de 250J/m^2 pendant 16 heures (J. Invest. Dermatol. 1995, 104 : 922-927). En présence du ligand PBR Ro 5-4864, il a été montré que l'on prévient les processus d'altérations cellulaires induits par l'irradiation dans une gamme de concentrations de ligand comprise entre 10 nM et 10 μM .

EXEMPLE 5

L'effet photoprotecteur du ligand a été évalué par application par voie cutanée sur le cobaye albinos.

La voie topique cutanée est utilisée afin de reproduire les conditions d'utilisation chez l'homme.

Des cobayes Hartley, Charles River France, Saint Aubin lès Elbeuf, 76410 Cléon, France, sont utilisés.

Les animaux ont été rasés puis épilés sur les flancs antérieurs droit et gauche, 24 heures avant le début du traitement.

Les animaux ont été irradiés juste avant le premier traitement. L'énergie est vérifiée avant chaque irradiation réalisée sur les flancs droit et gauche dans le spectre UVB à une dose de 4000 mJ/cm^2 .

Le flanc droit des animaux a été traité avec 0,2 ml de solution du ligand immédiatement après irradiation puis 2 et 5 heures après irradiation. Le flanc gauche ne sera pas traité.

Une lampe à vapeur de Xéron Haute pression (IDEM 300) produira l'irradiation.

Les lectures des réactions locales sont faites avant traitement, puis 5 et 24 heures après irradiation.

Erythème et oedème ont été évalués comme suit :

Erythème

0 pas d'érythème ; 1 érythème très faible, à peine perceptible ; 2 érythème net, rose faible ; 3 érythème net, rouge franc ; 4 érythème particulièrement intense

Oedème

0 pas d'oedème ; 1 très léger oedème (à peine visible) ; 2 léger oedème (contours bien définis et gonflement apparent) ; 3 oedème moyen (épaisseur d'environ 1 mm) ; 4 oedème grave (épaisseur supérieure à 1 mm et surface supérieure à la zone

d'application)

Des exemples de ligands naturels du recepteur PBR produits par fermentation sont décrits ci-après avec leur activité.

5 Un criblage ou screening effectué sur des extraits de microorganismes conduit sur milieu solide ou liquide a permis de sélectionner trois souches de microorganismes (bactéries et champignons microscopiques).

Les trois souches sélectionnées après différentes études menées pour optimiser les conditions de production de quantités significatives d'extraits de cultures possédant de
10 bonnes activités sur le test de mesure d'interaction avec le récepteur PBR ont pour références SRL 4988, SRL 5186 et SRL 5189.

Les trois souches ci-dessus ont été déposées à la CNCM de l'Institut Pasteur : date de 27 août 1999 avec respectivement les numéros d'ordre I-2305, I-2306, I-2307.

La souche SRL 4988 classée comme *Nocardia species*, isolée d'un échantillon de sol
15 a pour caractères écologico-physiologiques, déterminés après culture de deux semaines à 28° C sur milieu ISP2 : phototrophe négatif, chimio-organotrophe, mésophile et halophile négatif. Elle est non mobile et présente des spires ouvertes, non verticillées.

La souche SRL 5186 classée comme *Streptomyces species*, isolée d'un échantillon de
20 sol a pour caractères écologico-physiologiques, déterminés après culture de deux semaines à 28° C sur milieu ISP2 : phototrophe négatif, chimio-organotrophe, mésophile et halophile négatif. Elle est non mobile et présente des hyphes flexibles et biverticillées.

La souche SRL 5189 classée comme *Actinosynnema species* a pour caractères
25 écologico-physiologiques, déterminés après culture de deux semaines à 28° C sur milieu ISP2 : phototrophe négatif, chimio-organotrophe, mésophile, halophile négatif. Elle est non mobile et présente des hyphes flexibles et monoverticillés.

Ces souches constituent donc, ainsi que leurs mutants producteurs, un objet ultérieur de l'invention.

30 Après cultures sur milieu nutritif gélosé et plusieurs repiquages successifs qui permettent d'obtenir une culture abondante et pure, on fabrique un lot 0 de conservation de la souche mère puis des lots de semence primaire et secondaire.

Pour cela, on prépare une suspension de spores à partir d'une culture sur milieu nutritif gélosé en boîte de Pétri et d'un milieu de reprise ; ce milieu contient un
35 cryoprotecteur permettant d'assurer une bonne viabilité des spores lors de la conservation par congélation.

La suspension de spores obtenue est répartie dans des cryotubes qui seront conservés à - 80° C : ces tubes constituent le lot 0.

En suivant le même protocole, mais à partir d'un tube du lot 0, on prépare un lot de semence primaire. Puis toujours suivant le même protocole, on prépare un lot de semence secondaire à partir d'un cryotube de semence primaire. La fabrication des lots de semence 0, 1 et 2 assure une accessibilité durable de la souche et donc de l'activité recherchée. Les cultures de ces trois souches permettant d'obtenir des ligands naturels du récepteur PBR peuvent être menées de manière proche avec les moyens de cultures aérobies habituels, c'est-à-dire milieux liquides en fermenteurs de toute capacité avec contrôle en ligne du pH et de l'aération.

EXEMPLE A SRL 4988

A titre d'exemple de culture en fioles d'Erlenmeyer pour la souche SRL 4988 : un tube de semence secondaire est utilisé pour ensemercer des boîtes de Pétri préparées avec un milieu favorisant la sporulation des actinomycètes selon la composition :

Glucose	20 g
Soyoptim (SIO)	10 g
CaCO ₃ (OMYA)	3 g
Agar type E	20 g
Eau distillée QSP	1 l

On fait incuber les cultures sur boîtes pendant 5 jours à 28° C. On obtient alors une suspension de spores en ajoutant dans chaque boîte de Pétri, 10 ml d'un milieu liquide de composition :

Glucose	30 g
Soyoptim (SIO)	10 g
Tryptone U.S.P. (BIOKAR)	4 g
Extrait de levures (DIFCO)	8 g
NaCl	2,5 g
CaCO ₃	5 g
Hydrolysate de caséine	5 g
Peptone papainique de soja	5 g

dont le pH est ajusté à 7,0 avant stérilisation.

5 On utilise 5 ml des suspensions de spores pour inoculer des fioles stériles de 250 ml, garnies avec 50 ml du même milieu, qui constituent les précultures, mises à incuber en chambre chaude à 28° C sur un agitateur à étagères, ou dans un incubateur autonome, les vitesses de rotation sur l'un ou l'autre des systèmes étant réglées à 210 tours/mn.

10 Après deux jours d'agitation les fioles de préculture sont utilisées pour ensemer les fioles de culture proprement dites à raison de 5 ml de milieu de préculture par Erlenmeyer de 500 ml garni de milieu de culture (100 ml) de composition :

Glycérol	10 g
Amidon soluble	30 g
Soyoptim	15 g
Tryptone	2 g
Extrait de levure	5 g
CaCO ₃	5 g
Solution d'oligoéléments	10 ml
Eau QSP	1 l
pH 7	

Composition de la solution d'oligoéléments utilisée :

15

FeSO ₄ , 7 H ₂ O	1,0 g
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,025 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,10 g
H ₃ BO ₃	0,56 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	0,002 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,20 g
Eau QSP	1 l

Ainsi dans ce cas précis , 5 fioles de précultures ont été utilisées pour inoculer 40 fioles de cultures à 100 ml de milieu de culture par Erlenmeyer de 500 ml , qui après 6

jours de culture agitée à 28° C en chambre chaude sur un agitateur rotatif réglé à 210 tours/mn , fournissent 4 litres de suspension de bactéries.

Les 4 litres de moût de fermentation sont centrifugés en plusieurs opérations, à une température de 4°C, et au régime de 13500 tours/mn (soit 27 500g avec le rotor utilisé), afin de séparer la biomasse, c'est à dire le culot rassemblant les cellules du surnageant de culture constitué majoritairement d'eau provenant du milieu nutritif utilisé et contenant en solution des restes de composants du milieu nutritif ainsi que des métabolites produits et excrétés par les cellules des bactéries pendant les diverses phases de leur croissance .

Les biomasses et surnageants sont alors congelés à -20° C .

EXTRACTION DES LIGANDS NATURELS DU RECEPTEUR PBR

Les 4 litres de surnageant décongelé sont chargés dans un b cher de 10 litres. On additionne la solution de 400 g de résine polystyrène-divinylbenzène Amberlite XAD 16 (Rohm & Haas). La suspension est agit e avec un moteur équipé d'un arbre à pales, tournant à 20 tours/mn, pendant 15 heures. La solution est ensuite filtrée, le filtrat est éliminé et la résine essor e est reprise par 1 litre de méthanol. On laisse sous agitation douce pendant 1 heure. On filtre à nouveau la résine que l'on retraits à l'identique avec 1 litre de méthanol. Lors d'une troisième opération la résine est retrait e cette fois avec 1 litre d'acétone. La résine essor e est alors  limin e et les 3 litres de solvant organique rassemblés sont évaporés à sec dans un évaporateur rotatif sous vide.

Le résidu d'évaporation (17,7g) est trituré avec 50 ml de méthanol, la suspension obtenue est centrifug e à 3000 tours/mn pendant 15 minutes, et le surnageant décanté obtenu constitue l'extrait de surnageant de culture.

Cet extrait est testé en dilution en inhibition du binding sur le récepteur PBR et fournit une activité  valu e au 1/200 (50 % d'inhibition).

Les biomasses rassembl es (199g) dans un b cher de 2 litres sont trait es sous agitation par un mélange de 750 ml de chlorure de méthylène et de 750 ml de méthanol. L'agitation est maintenue pendant 15 heures à température ambiante. La suspension est ensuite filtrée et la solution limpide obtenue est concentr e sous vide dans un évaporateur rotatif. Le résidu d'évaporation (5,4g) est alors trituré avec 50 ml de méthanol et constitue l'extrait de biomasse .

Cet extrait est testé en inhibition du binding du récepteur PBR et fournit une activité mesur e au 1/2200 ($DI_{50} = 2200^{-1}$).

EXEMPLE B SRL 5186

Avec les mêmes protocoles et milieux respectifs :

- milieu gélosé pour les repiquages sur boîte de Pétri
- milieu liquide de préculture
- 5 - milieu liquide de production ,

14 fioles d'Erlenmeyer de 500 ml garnies de 100 ml de milieu de production, et inoculées à 5 %, sont incubées à 28 °C en chambre chaude sur un agitateur rotatif tournant à 210 tours/mn, pendant 6 jours .

Après centrifugation et stockage un à deux jours au congélateur à - 20°C des biomasses et surnageants de production, on décongèle ces produits avant de procéder à leur extraction .

Les biomasses (54,9 g) sont traitées dans un bécher, sous agitation par un mélange de 250 ml de dichlorométhane et 250 ml de méthanol , pendant une dizaine d'heures. La suspension est ensuite filtrée et la solution limpide obtenue est concentrée à sec avec un évaporateur rotatif.

Le résidu sec (1,4 g) est trituré avec 17,5 ml de méthanol, et la suspension obtenue est centrifugée à 3000 tours/mn pendant 15 minutes. Le surnageant de centrifugation prélevé, constitue l'extrait de biomasse.

Cet extrait, évalué en dilution sur le test d'inhibition du binding au récepteur PBR fournit une inhibition de 50 % dans le test à la dilution 1/3750 ($DI_{50} = 3750^{-1}$) .

Les 1400 ml de surnageant décongelé sont additionnés de 160 g de résine polystyrène-divinylbenzène XAD 16 (Rohm & Haas) et la suspension est agitée pendant 15 heures. La résine est filtrée, le filtrat est éliminé et la résine est retraitée par 200 ml de solution à 25 % de méthanol dans l'eau pendant 3 heures.

La résine est filtrée, et ce deuxième filtrat est éliminé. La résine subit alors trois traitements semblables, deux avec 200 ml de méthanol et le dernier avec 200 ml d'acétone. Ces trois derniers filtrats sont rassemblés dans un ballon puis concentrés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu (2,2 g) est alors trituré avec 17,5 ml de méthanol et la solution obtenue constitue l'extrait de surnageant .

Cet extrait évalué en dilution sur le test d'inhibition du binding au récepteur PBR donne une inhibition de 50 % à la dilution 1/940 ($DI_{50} = 940^{-1}$)

EXEMPLE C SRL 5189

Avec les mêmes protocoles et milieux respectifs :

- milieu gélosé pour les repiquages sur boîte de Pétri
- milieu liquide de préculture

5 - milieu liquide de production

10 fioles d'Erlenmeyer de 500 ml garnies de 100 ml de milieu de production, et inoculées à 5 %, sont incubées à 28 °C en chambre chaude sur un agitateur rotatif tournant à 210 tours/mn, pendant 8 jours.

10 Après centrifugation et stockage un à deux jours au congélateur à - 20°C des biomasses et surnageants de production, on décongèle ces produits avant de procéder à leur extraction.

15 Les biomasses (69,5 g) sont traitées dans un bécher, sous agitation par un mélange de 150 ml de dichlorométhane et 150 ml de méthanol pendant une dizaine d'heures. La suspension est ensuite filtrée et la solution limpide obtenue est concentrée à sec avec un évaporateur rotatif. Le résidu sec (1,5 g) est trituré avec 12,5 ml de méthanol, et la suspension obtenue est centrifugée à 3000 tours/mn pendant 15 minutes. Le surnageant de centrifugation prélevé, constitue l'extrait de biomasse . Cet extrait, évalué en dilution sur le test d'inhibition du binding au récepteur PBR fournit une inhibition de 50 % dans le test à la dilution 1/2600 ($DI_{50} = 2600^{-1}$).

20 Les 1000 ml de surnageant décongelé sont additionnés de 100 g de résine polystyrène-divinylbenzène XAD 16 (Rohm & Haas) et la suspension est agitée pendant 15 heures. La résine est filtrée, le filtrat est éliminé et la résine est retraitée par 150 ml de solution à 25 % de méthanol dans l'eau pendant 3 heures. La résine est
25 filtrée, et ce deuxième filtrat est éliminé. La résine subit alors trois traitements semblables, deux avec 150 ml de méthanol et le dernier avec 150 ml d'acétone. Ces trois derniers filtrats sont rassemblés dans un ballon puis concentrés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu (1,7 g) est alors trituré avec 12,5 ml de méthanol et la solution obtenue constitue l'extrait de surnageant .

30 Cet extrait évalué en dilution sur le test d'inhibition du binding au récepteur PBR donne une inhibition de 50 % à la dilution 1/600 ($DI_{50} = 500^{-1}$) .

35 Dans les compositions selon l'invention, la substance se liant à PBR est utilisée de préférence en une quantité allant de 0,00001 à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition, et en particulier en une quantité allant de 0,001 à 10 % en poids par rapport au poids total de la composition.

Les compositions selon l'invention peuvent se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées pour une application topique.

Les quantités des différents constituants des compositions selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés et sont appropriées à leur forme galénique.

Pour une application topique, les compositions de l'invention comprennent un milieu compatible avec la peau. Ces compositions peuvent se présenter notamment sous forme de solutions aqueuses, alcooliques ou hydroalcooliques, de gels, d'émulsions eau-dans-huile ou huile-dans-eau ayant l'aspect d'une crème ou d'un gel, de microémulsions, d'aérosols, ou encore sous forme de dispersions vésiculaires contenant des lipides ioniques et/ou non ioniques. Ces formes galéniques sont préparées selon les méthodes usuelles des domaines considérés.

Ces compositions à application topique peuvent constituer notamment une composition de protection, de traitement ou de soin cosmétique ou dermatologique pour le visage, pour le cou, pour les mains ou pour le corps, (par exemple crèmes de jour, crèmes de nuit, crèmes ou huiles solaires, laits corporels), une composition de maquillage (par exemple fond de teint) ou une composition de bronzage artificiel.

Quand la composition de l'invention est une émulsion, la proportion de corps gras qu'elle contient peut aller de 5 % à 80 % en poids, et de préférence de 5 % à 50 % en poids par rapport au poids total de la composition. Les corps gras et les émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine cosmétique ou dermatologique.

Comme corps gras utilisables dans l'invention, on peut citer les huiles minérales (vaseline), les huiles végétales (fraction liquide de beurre de karité) et leurs dérivés hydrogénés, les huiles animales, les huiles de synthèse (perhydrosqualène), les huiles siliconées (diméthylpolysiloxane) et les huiles fluorées. Comme autres corps gras, on peut encore citer les alcools gras (alcool cétylique, alcool stéarylique), les acides gras (acide stéarique) et les cires.

Les émulsionnants peuvent être présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3 % à 30 % en poids et de préférence de 0,5 à 30 % en poids par rapport au poids total de la composition.

De façon connue, les compositions cosmétiques ou dermatologiques de l'invention peuvent contenir également des adjuvants habituels dans les domaines correspondants, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres et les matières colorantes. Par ailleurs, ces compositions peuvent contenir des actifs hydrophiles ou

lipophiles. Les quantités de ces différents adjuvants ou actifs sont celles classiquement utilisées dans le domaine cosmétique au dermatologique, et par exemple de 0,01 % à 20 % du poids total de la composition. Ces adjuvants ou ces actifs, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse et/ou dans des vésicules lipidiques.

Parmi les actifs que peuvent contenir les compositions de l'invention, on peut notamment citer les actifs ayant un effet sur le traitement des rides ou des ridules, et en particulier les actifs kératolytiques. Par kératolytique, on entend un actif ayant des propriétés desquamantes, exfoliantes ou gommantes, ou un actif capable de ramollir la couche cornée.

Parmi ces actifs ayant un effet sur le traitement des rides ou des ridules que peuvent contenir les compositions de l'invention, on peut en particulier citer les hydroxyacides et les rétinoïdes.

Les hydroxyacides peuvent être par exemple des α -hydroxyacides ou des β -hydroxyacides, qui peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés. Les atomes d'hydrogène de la chaîne carbonée peuvent, en outre, être substitués par des halogènes, des radicaux halogénés, alkylés, acylés, acyloxylés, alcoxy carbonylés ou alcoxylés ayant de 2 à 18 atomes de carbone.

Les hydroxyacides qui peuvent être utilisés sont notamment les acides glycolique, lactique, malique, tartrique, citrique, hydroxy-2 alcanolique, mandélique, salicylique, ainsi que leurs dérivés alkylés comme l'acide n-octanoyl-5-salicylique, l'acide n-dodécanoyl-5-salicylique, l'acide n-décanoyl-5-salicylique, l'acide n-octyl-5-salicylique, l'acide n-heptyloxy-5 ou -4-salicylique, l'acide 2-hydroxy-3-méthylbenzoïque, ou encore leurs dérivés alcoxylés comme l'acide 2-hydroxy-3-méthoxybenzoïque.

Les rétinoïdes peuvent être notamment l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol (vitamine A) et ses esters tels que le palmitate de rétinol, l'acétate de rétinol et le propionate de rétinol, ainsi que leurs sels.

Ces actifs peuvent être utilisés en particulier à des concentrations allant de 0,0001 % à 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

REVENDECATIONS

- 5 1. Utilisation d'au moins une substance se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines ou PBR, pour la fabrication d'une composition cosmétique, pharmacologique ou dermatologique topique dans le traitement du stress cutané.
- 10 2. Utilisation d'au moins une substance se liant au PBR pour la fabrication d'une composition cosmétique et/ou dermatologique topique en vue de diminuer les rides, de réduire l'érythème solaire ou de protéger contre les radicaux libres.
- 15 3. Utilisation selon l'une des revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la substance se liant au PBR est un agoniste du PBR choisi parmi les molécules de synthèse, les substances naturelles d'extraction ou une substance obtenue par fermentation.
- 20 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que la substance se liant au PBR est le Ro 5-4864.
- 25 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que la substance se liant au PBR est une substance obtenue par fermentation.
- 30 6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la substance est présente dans la composition cosmétique ou dermatologique en une quantité allant de 0,00001 à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition.
- 35 7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que la substance agoniste est présente dans la composition cosmétique ou dermatologique en une quantité allant de 0,001 à 10 % en poids par rapport au poids total de la composition.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la composition contient en outre un hydroxyacide et/ou un rétinoïde.
9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'hydroxyacide est choisi parmi les α -hydroxyacides ou les β -hydroxyacides, qui peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que le rétinoïde est choisi dans le groupe comprenant l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol et ses esters.

5 11. Composition cosmétique et/ou dermatologique topique caractérisée en ce qu'elle contient en tant que principe actif une substance se liant au PBR.

12. Souche *Nocardia species* SRL 4988 déposée auprès de la C.N.C.M. de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2305 et ses mutants producteurs.

10

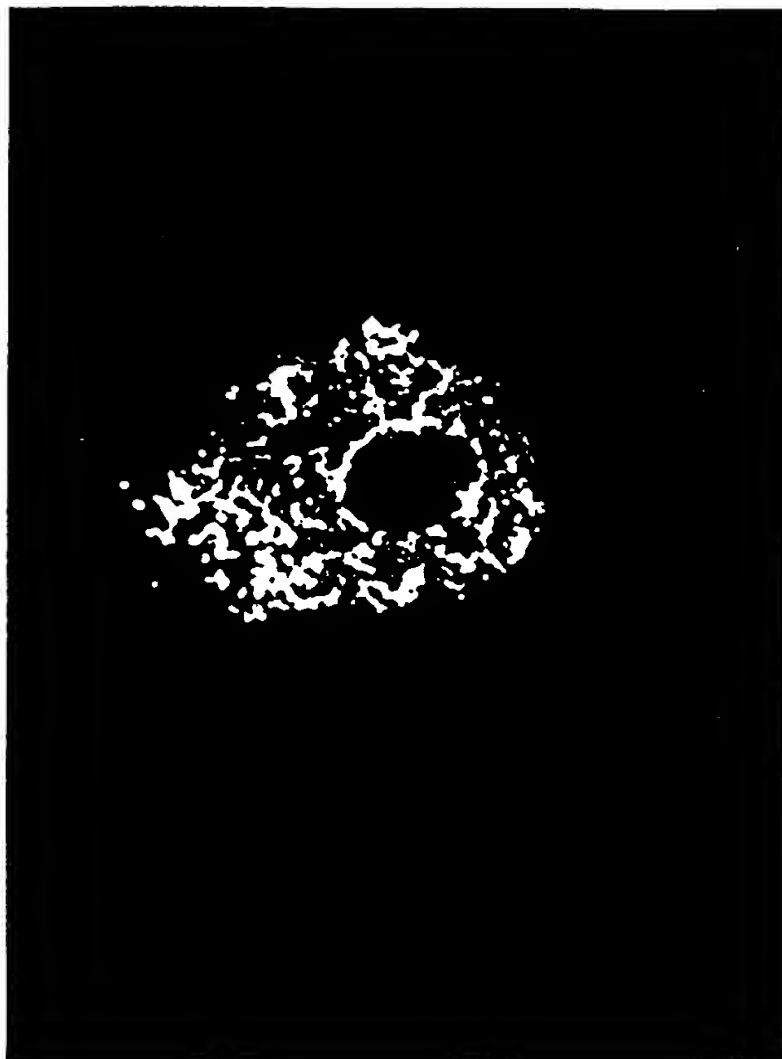
13. Souche *Streptomyces species* SRL 5186 déposée auprès de la C.N.C.M. de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2306 et ses mutants producteurs.

15

14. Souche *Actinosynnema species* SRL 5189 déposée auprès de la C.N.C.M. de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2307 et ses mutants producteurs.

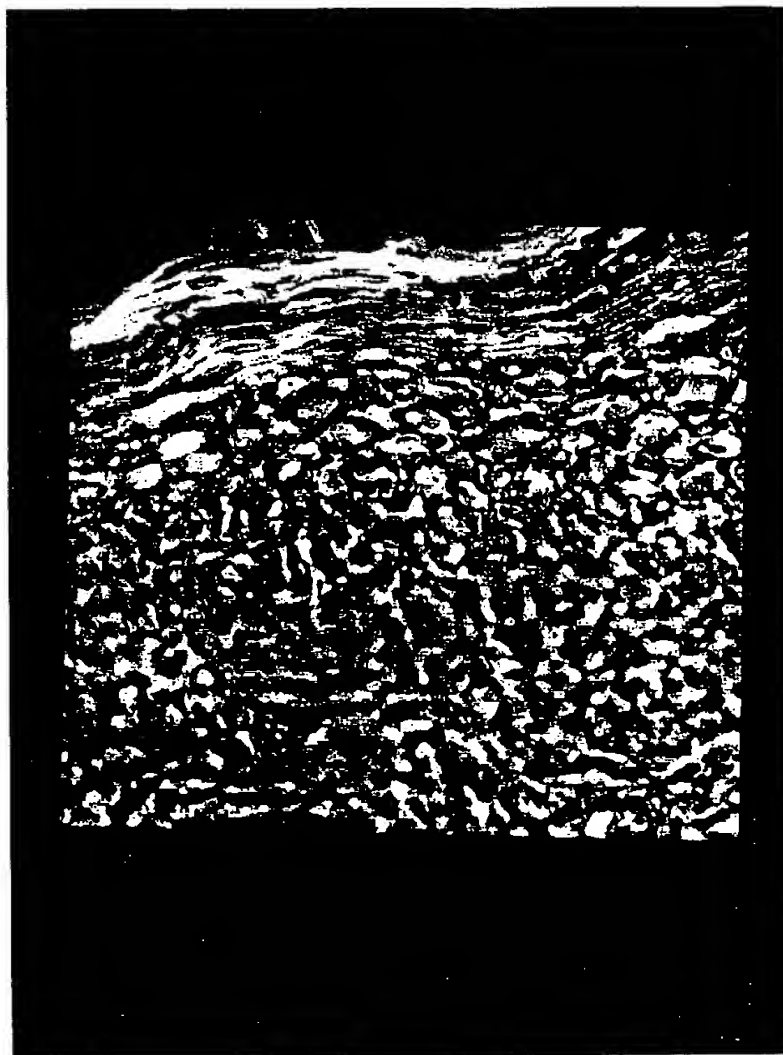
15. Composition cosmétique et/ou dermatologique topique caractérisée en ce qu'elle contient en tant que substance active une substance obtenue par fermentation d'une souche selon les revendications 12 à 14.

20



Analyse en microscopie confocale à l'aide de l'anticorps 8D7
de la localisation mitochondriale du récepteur PBR
sur kératinocytes A431 (coloration verte).

FIGURE 1

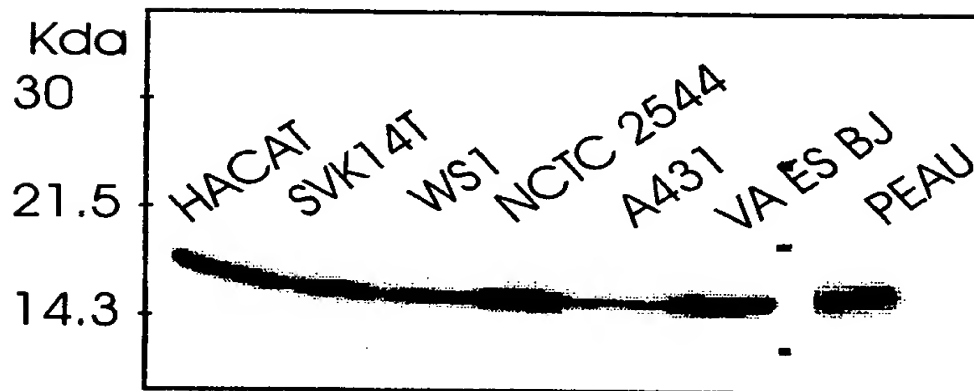


L'analyse immuno-histologique réalisée sur une coupe d'épiderme humain normal révèle une expression croissante de PBR du *stratum basale* vers le *stratum corneum* (coloration rouge).

FIGURE 2

Expression de PBR sur des lignées
de kératinocytes et de peau
humaine normale :

Analyse par Western Blot

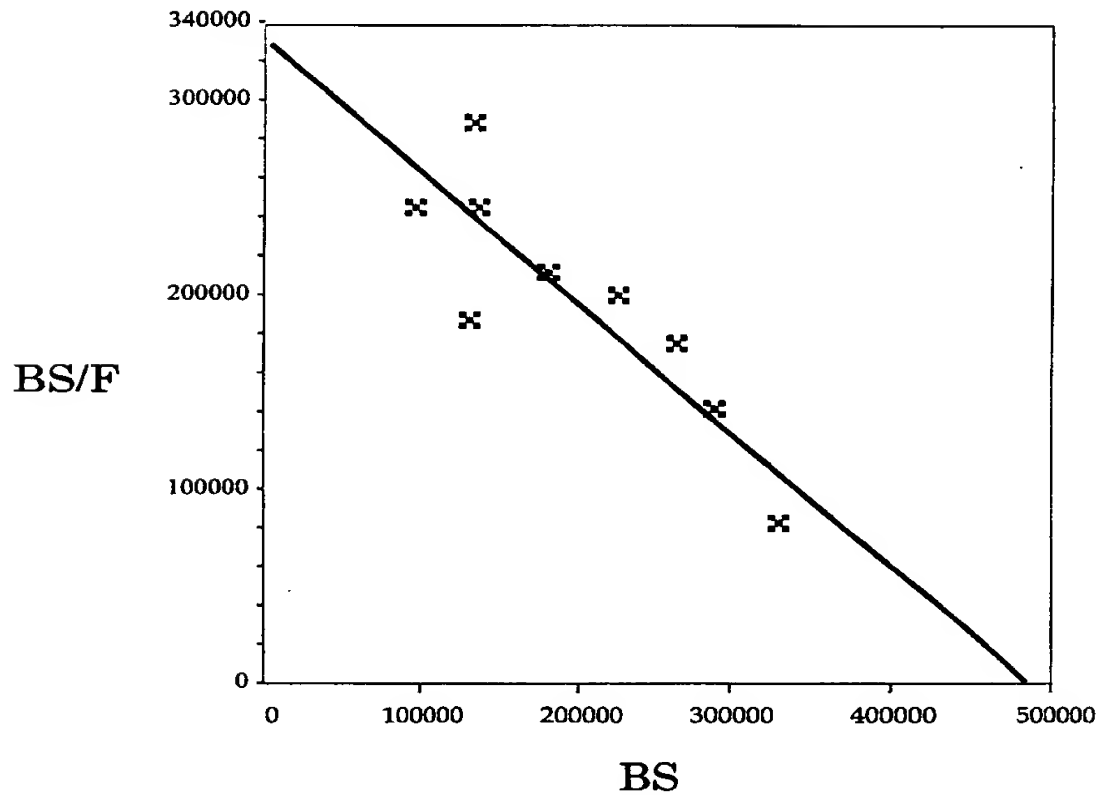


Marquage anticorps 8D7 ($1\mu\text{g} / \text{ml}$ final)

Les dépôts sont normalisés par dosage des protéines totales en lysat:
dépôts pour chaque lignée $30\mu\text{g}$

FIGURE 3

Etude de Scatchard sur Kératinocytes A431

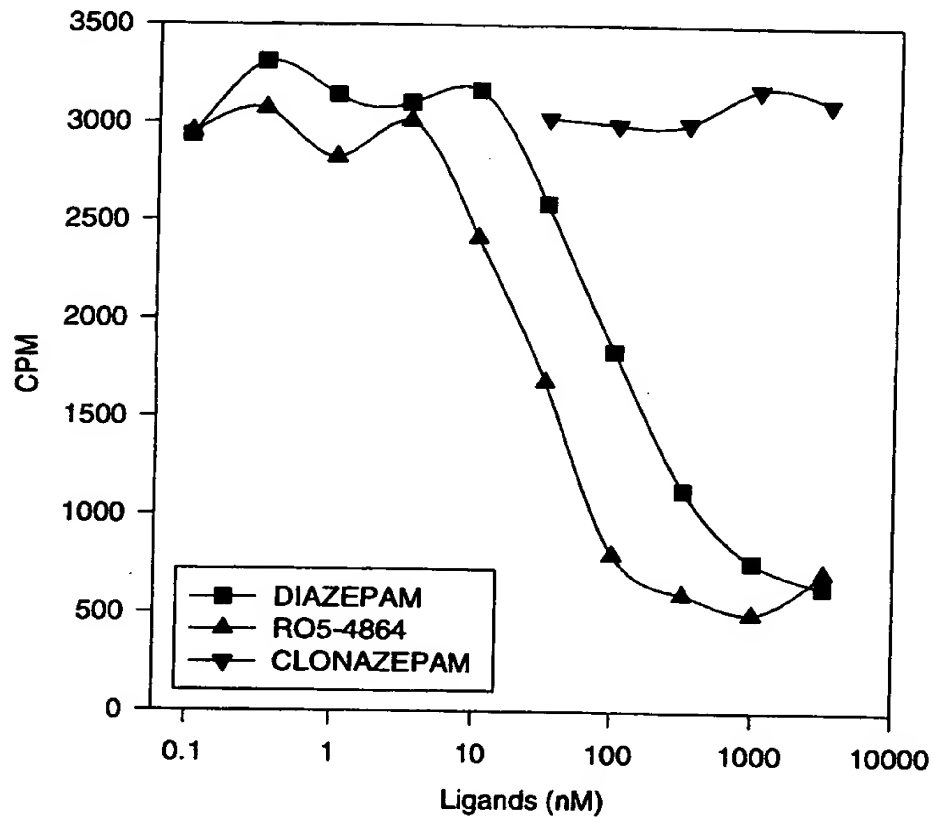


$B_{\max} = 472000 \pm 68000$ Récepteurs / Cellule

$KD = 1.5 \pm 0.3$ mM

FIGURE 4

Pr fil pharmac I gique des ligands du PBR sur Kératin cyt s A431



Courbe de déplacement du ligand de référence [3H]-PK11195
par le Ro5-4864 (ligand périphérique) le clonazépam (ligand central)
et le diazépam (ligand mixte).

FIGURE 5



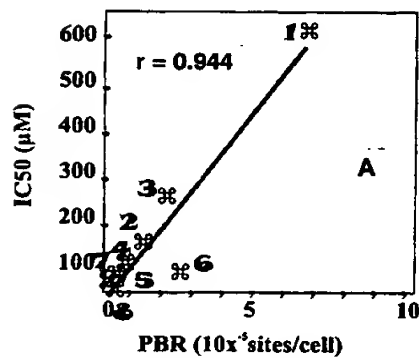
•

•

r

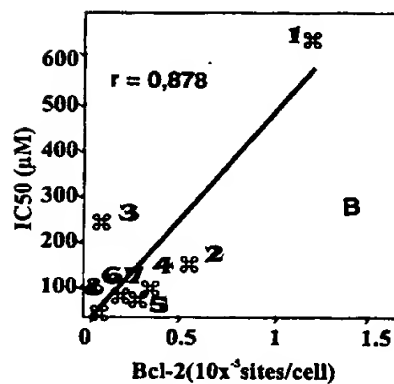
t

**Implication de PBR dans la protection des cellules hématopoïétiques
contre les dommages causés par les radicaux oxygénés**

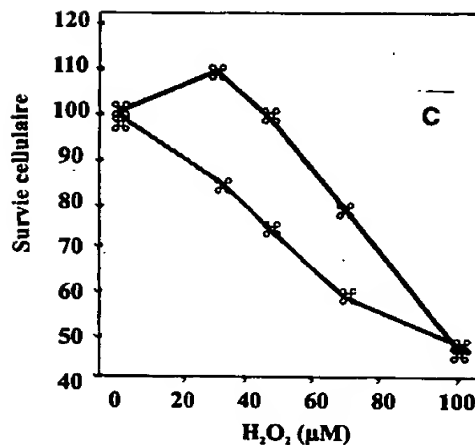


Corrélation entre le niveau d'expression de PBR [A] et de Bcl-2 [B] et de la résistance à la toxicité de H₂O₂

1 = THP1 2 = U937 3 = K562
4 = IM9 5 = CEM 6 = NALM-6
7 = JURKAT 8 = RAJI



Les concentrations d'H₂O₂ induisant 50% de toxicité après 24 H d'incubation [IC₅₀] sont exprimées en fonction du nombre de sites PBR ou Bcl-2.



Viabilité des cellules JURKAT sauvages ○ et transfectées avec le PBR ● vis à vis de la toxicité de H₂O₂ après 24 H d'incubation

FIGURE 6

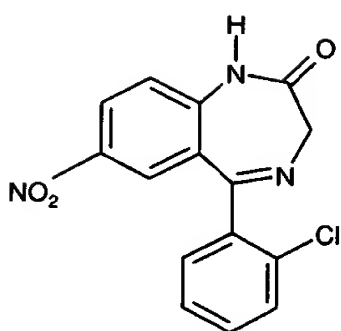


■

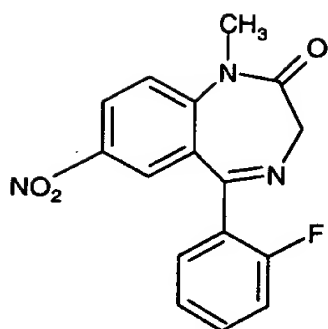
●

⋈

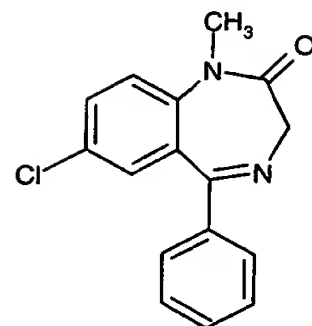
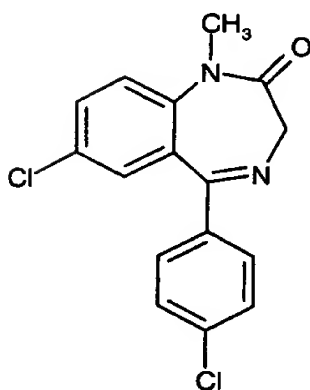
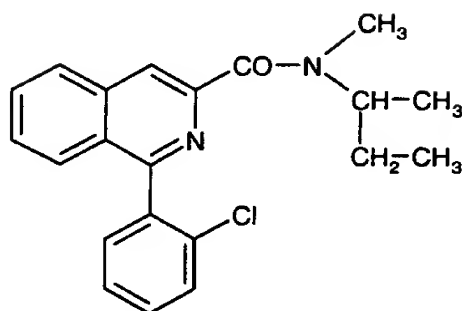
⋈



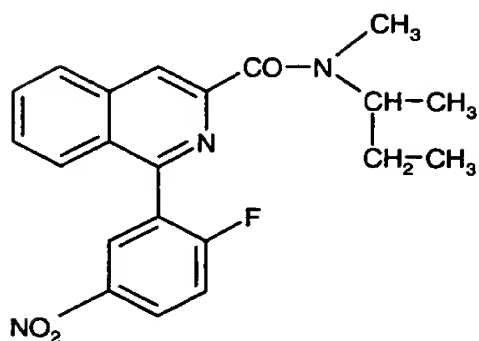
CLONAZEPAM



FLUNITRAZEPAM

DIAZEPAM
Ro 5-2807CHLORODIAZEPAM
Ro 5-4864

PK 11195




PK 14105

**Principaux ligands des récepteurs centraux et
périphériques des benzodiazépines**

FIGURE 7

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1087D/PM	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02761	Date du dépôt international (jour/mois/année) 10/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 17/11/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K7/00		
Déposant SANOFI-SYNTHELABO et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input checked="" type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input checked="" type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 05/06/2000	Date d'achèvement du présent rapport 27.03.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Lindner, A N° de téléphone +49 89 2399 8640	



RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02761

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17.)*) :

Description, pages:

1-14 version initiale

Revendications, N°:

1-15 version initiale

Dessins, feuilles:

1/7-7/7 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02761

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☐ les revendications n°s .

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications n°s en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☒ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s 14 (totalement), 15 (partiellement) en question.

2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire international significatif:

- ☐ le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02761

- ☐ le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a
- ☐ limité les revendications.
 - ☒ payé des taxes additionnelles.
 - ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
 - ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.
2. ☐ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.
3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,
- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
 - ☒ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
voir feuille séparée
4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :
- ☐ toutes les parties de la demande.
 - ☒ les parties relatives aux revendications n°s 1-11 et 15 (partiellement), 12 et 13 (totalement).

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	1-10, 12-13, 15
	Non :	Revendications	11
Activité inventive	Oui :	Revendications	1-10, 15
	Non :	Revendications	12-13
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	11-13, 15
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications **voir feuille séparée**

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02761

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Concernant le point IV**Absence d'unité de l'invention**

1. L'administration chargée de l'examen préliminaire internationale a trouvé les groupes d'invention suivants dans la présente demande internationale:

- a. revendications 1 - 11 et 15 (partiellement) et 12 (totalement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche *Nocardia* sp. SRL 4988 et la souche même.

- b. revendications 1 - 11 et 15 (partiellement) et 13 (totalement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche *Streptomyces* sp. SRL 5186 et la souche même

Le problème technique à résoudre dans la présente demande est l'obtention d'une méthode améliorée de traitement du stress cutané. La solution proposée étant l'utilisation des benzodiazépines ou d'autres composés se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines.

Deux souches de microorganismes, appartenant aux genres *Nocardia* et *Streptomyces* sont revendiquées en tant que productrices des substances du type benzodiazépine, cette propriété constituerait le concept inventive commun à toutes les deux souches.

Pourtant, il était déjà connu que les genres *Nocardia* et *Streptomyces* produisent des substances du type benzodiazépine aptes à l'utilisation médicale. Les documents pertinents à cet effet sont:

JP-A-54073195 (*Nocardia*) voir le résumé

•
• • •
•

•

•

RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Demande internationale n° PCT/FR99/02761

JP-A-56121495 (Streptomyces) voir le résumé
US-A-4 011 140 (Streptomyces) voir p. 1, l. 10-20
GB-A-1 299 198 (Streptomyces), voir le résumé

Ces documents détruisent l'unité d'invention des deux souches différentes, vu que le concept inventif général, à savoir la capacité de produire des benzodiazépines n'est pas nouveau. En absence d'autres caractéristiques spéciales, la demande manque d'unité d'invention (Règles 13.1 et 13.2 PCT).

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventiv et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

2. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1 = ORMFA ET AL.: "Ricerca preliminari clinico-psichologiche su di un nuovo derivato benzodiazepinico (Nobrium) in dermatologia" Giornale Italiano di Dermatologia. Minerva Dermatologica, vol. 45, no. 5, mai 1970 (1970-05), pages 325-329
D2 = Editions du Vidal, 1993, p. 1504, Valium Roche
D3 = JP-A-54073195 (résumé WPI)
D4 = JP-A-56121495 (résumé WPI)
D5 = US-A-4 011 140
D6 = GB-1 299 198

3. D1 décrit des solutions alcooliques de Nobrium (dérivé d'une benzodiazépine) (D1: abrégé; p. 325, 5ème paragraphe de la colonne gauche: 'l'azione del Nobrium ... associato a sostanze alcoliche...'). En conséquence, D1 détruit la nouveauté de la présente revendication 11 (article 33(2)). En outre, il y a lieu de noter que des solutions injectables comprenant le diazépam (D2) sont susceptibles d'être appliquées sur la peau (même si cette utilisation n'est pas envisagée dans D2). En conséquence, l'objet de la revendication 11 est anticipé

par D2 (article 33(2) PCT; voir aussi les Directives PCT, C-IV, 7.6).

4. Il est déjà connu que les genres *Nocardia* et *Streptomyces* produisent des substances du type benzodiazépine aptes à l'utilisation médicale. La sélection des souches telles que revendiquées dans les revendications 12-13 n'implique une activité inventive que pour le cas, où elle est accompagnée par des effets non-évidents, ce qui ne semble pas être le cas.
5. Quant aux revendications 1-10, il n'y a pas d'objections par rapport à la nouveauté et l'activité inventive, vu que l'utilisation telle que revendiquée n'est ni décrite ni rendue évidente dans les documents figurant dans le rapport de recherche.
6. Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si les revendications 1-10 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

7. La formulation 'utilisation d'une substance pour la préparation d'une composition pour traiter une maladie' n'est applicable que pour les utilisations thérapeutiques. D'autres utilisations, y comprise l'utilisation cosmétique, n'y sont pas incluses et devraient être revendiquées séparément.

Translation
09/831720

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER
NOV 16 2001
1500/2900

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference 1087D/PM	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02761	International filing date (day/month/year) 10 November 1999 (10.11.99)	Priority date (day/month/year) 17 November 1998 (17.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 7/00		
Applicant SANOFI-SYNTHELABO		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05 June 2000 (05.06.00)	Date of completion of this report 27 March 2001 (27.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02761

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages _____ 1-14 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____ 1-15 _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages _____ 1/7-7/7 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02761

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 14 (entirely), 15 (in part)

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 14 (entirely), 15 (in part)

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02761

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See Supplemental Box

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-11 and 15 (in part), 12 and 13 (entirely)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02761

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

1. The International Preliminary Examining Authority has identified the following groups of inventions in the present international application:

- a. Claims 1-11 and 15 (in part) and Claim 12 (in full)

The use of substances binding to the peripheral benzodiazepine receptor in cosmetics, pharmacology or dermatology, compositions containing same, and the production of the active principle by fermenting the *Nocardia* sp. SRL 4988 strain, and the strain itself.

- b. Claims 1-11 and 15 (in part) and Claim 13 (in full)

The use of substances binding to the peripheral benzodiazepine receptor in cosmetics, pharmacology or dermatology, compositions containing same, and the production of the active principle by means of fermentation of the *Streptomyces* sp. SRL 5186 strain, and the strain itself.

The technical problem to be solved in the present application is that of providing an improved method for treating skin stress. The solution proposed is that of using benzodiazepines or other compounds binding to the peripheral benzodiazepine receptor.

Two strains of microorganisms belonging to the genera *Nocardia* and *Streptomyces* are claimed as producers of substances such as benzodiazepine and

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

this property would appear to be the inventive concept common to both strains.

However, it is already known that genera *Nocardia* and *Streptomyces* produce substances such as benzodiazepine suitable for medical use. In this regard, the relevant documents are:

JP-A-54073195 (*Nocardia*): see the abstract

JP-A-56121495 (*Streptomyces*): see the abstract

US-A-4 011 140 (*Streptomyces*): see page 1,
lines 10-20

GB-A-1 299 198 (*Streptomyces*): see the abstract

These documents are prejudicial to the unity of invention of the two separate strains since the general inventive concept, namely, the ability to produce benzodiazepines, is not novel. In the absence of any other special features, the application lacks unity of invention (PCT Rules 13.1 and 13.2).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02761

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10, 12-13, 15	YES
	Claims	11	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10, 15	YES
	Claims	12-13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	11-13, 15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

2. Reference is made to the following documents:

D1: ORMFA ET AL: "Ricerca preliminari clinico-psichologiche su di un nuovo derivato benzodiazepinico (Nobrium) in dermatologia" Giornale Italiano di Dermatologia, Minerva Dermatologica, Vol. 45, No. 5, May 1970 (1970-05), pages 325-329

D2: Editions du Vidal, 1993, page 1504, Valium Roche

D3: JP-A-54073195 (WPI abstract)

D4: JP-A-56121495 (WPI abstract)

D5: US-A-4 011 140

D6: GB-A-1 299 198

3. D1 describes alcohol solutions of Nobrium (a benzodiazepine derivative) (D1: the abstract; page 325, fifth paragraph in the left-hand column: "l'azione del Nobrium ... associato a sostanze alcoliche ..."). As a result, D1 is prejudicial to the novelty of the present Claim 11 (PCT Article 33(2)). Moreover, it should be noted that injectable solutions containing diazepam (D2) are

capable of being applied to skin (even if this use is not envisaged in D2). It follows that the subject matter of Claim 11 is anticipated by D2 (PCT Article 33(2); see also the PCT Guidelines, C-IV, 7.6).

4. It is already known that genera *Nocardia* and *Streptomyces* produce benzodiazepine-type substances suitable for medical use. The selection of the strains, as claimed in Claims 12-13, can only involve an inventive step if it leads to non-obvious effects, which does not appear to be the case.
5. There are no objections with respect to novelty and inventive step concerning Claims 1-10 since the use, as claimed, is neither described in nor obvious from the search report documents.
6. The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing whether Claims 1 to 10 are industrially applicable. Patentability may also be dependent on the way in which the claims are worded. The European Patent Office, for example, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims to the medical use of a compound, but may allow, however, claims to the first medical use of a known compound as well as claims to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a novel medical treatment.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02761

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The wording "the use of a substance for preparing a composition for treating a disease" is only applicable to therapeutic uses. Other uses, including a cosmetic use, are not covered by such wording and should be claimed separately.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 août 2000 (01.08.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02761	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1087D/JM
Date du dépôt international (jour/mois/année) 10 novembre 1999 (10.11.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 17 novembre 1998 (17.11.98)
Déposant CASELLAS, Pierre etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

05 juin 2000 (05.06.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite
☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé R. Forax
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

...nde Internationale No

PCT/FR 99/02761

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K7/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEVY: "A psychosomatic approach to the management of recalcitrant dermatoses" PSYCHOSOMATICS, vol. 4, no. 6, novembre 1963 (1963-11), pages 334-337, XP000878884 le document en entier	1-3
X	ORMFA ET AL.: "Ricerche preliminari clinico psicologica su di un nuovo derivato benzodiazepinico (Nobrium) in dermatologia" GIORNALE ITALIANO DI DERMATOLOGIA. MINERVA DERMATOLOGICA, vol. 45, no. 5, mai 1970 (1970-05), pages 325-339, XP000878885 le document en entier	1-3

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

Norm et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Alvarez Alvarez, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 99/02761

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CARAYON ET AL.: "Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection..." BLOOD, vol. 87, no. 8, avril 1996 (1996-04), pages 3170-3178, XP002091195 cité dans la demande discussion figure 4</p>	
A	<p>BOH: "Role of reactive oxygen species in dermatologic diseases" CLINICS IN DERMATOLOGY, vol. 14, no. 4, juillet 1996 (1996-07), pages 343-352, XP000878889</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°
PCT/FR 99/02761

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°s -
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n°s -
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n°s
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☒ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir
1-13, 15 (partiellement)
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☒ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-12 (totalement) et 15 (partiellement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche *Nocardia* sp. SRL4988 et la souche même.

2. revendications: 1-11, 13 (totalement) et 15 (partiellement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche *Streptomyces* sp. SRL 5186 ainsi que la souche même.

3. revendications: 1-11, 14 (totalement) et 15 (partiellement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche *Actinossinema* sp. SRL 5189 et la souche même.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1-11 présentes ont trait à un produit/composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir, la capacité de liaison au récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR)

Les revendications couvrent tous les produits/composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels produits/composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le produit/composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé. Toutes les revendications ont été recherchées mais la recherche a été limitée aux benzodiazépines mêmes et spécialement aux composés mentionnés dans la revendication 4 et la figure 7. (Art. 17.2 PCT)

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.



1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 99/02761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEVY: "A psychosomatic approach to the management of recalcitrant dermatoses" PSYCHOSOMATICS, vol. 4, no. 6, November 1963 (1963-11), pages 334-337, XP000878884 the whole document	1-3
X	ORMFA ET AL.: "Ricerche preliminari clinico psicologiche su di un nuovo derivato benzodiazepinico (Nobrium) in dermatologia" GIORNALE ITALIANO DI DERMATOLOGIA. MINERVA DERMATOLOGICA, vol. 45, no. 5, May 1970 (1970-05), pages 325-339, XP000878885 the whole document	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 May 2000

Date of mailing of the international search report

15. MAI 2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alvarez Alvarez, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No
PCT/FR 99/02761

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CARAYON ET AL.: "Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection..." BLOOD, vol. 87, no. 8, April 1996 (1996-04), pages 3170-3178, XP002091195 cited in the application discussion figure 4 ---	
A	BOH: "Role of reactive oxygen species in dermatologic diseases" CLINICS IN DERMATOLOGY, vol. 14, no. 4, July 1996 (1996-07), pages 343-352, XP000878889 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02761

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: -
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet INFORMATION FOLLOW-UP PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-13, 15 (partly)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02761

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-12 (wholly) and 15 (partly)

Use of substances binding with the peripheral benzodiazepine receptor in cosmetics, pharmacology or dermatology, their compositions, method for obtaining the active substance by fermentation of the *Nocardia* sp. SRL 4988 strain and the strain itself.

2. Claims: 1-11, 13 (wholly) and 15 (partly)

Use of substances binding with the peripheral benzodiazepine receptor in cosmetics, pharmacology or dermatology, their compositions, method for obtaining the active substance by fermentation of the *Streptomyces* sp. SRL 5186 strain and the strain itself.

3. Claims: 1-11, 14 (wholly) and 15 (partly)

Use of substances binding with the peripheral benzodiazepine receptor in cosmetics, pharmacology or dermatology, their compositions, method for obtaining the active substance by fermentation of the *Actinossinema* sp. SRL 5189 strain and the strain itself.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02761

Continuation of Box I.2

Claims 1-11 of the present application concern a product/compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely, the capacity to bind with the peripheral benzodiazepine receptor (PBR)

The claims cover all the products/compounds having said characteristic or property, whereas the application provides a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 for only a very limited number of such products/compounds. In the present case, the claims are so lacking in support basis and the application is so lacking in disclosure that it is not possible to carry out any significant search on the whole scope covered by the claims. Notwithstanding the reasons stated above, the claims also lack clarity. Indeed, there has been an attempt to define the product/compound by the result to be achieved. In the present context, said lack of clarity is likewise such that it is not possible to carry out any significant search on the whole scope covered by the claims. Consequently, the search was carried out only for those parts of the claims whereof the subject matter is deemed to be clear, supported and properly disclosed.

Search was carried out for all the claims but the search was limited to the benzodiazepines themselves and particularly to the compounds mentioned in Claim 4 and in figure 7. (PCT Article 17.2)

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1 (e)). The applicant is advised that the guideline adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter unless a search has been carried out thereon. This position will remain unchanged, notwithstanding that the claims have or have not been modified, either after receiving the search report, or during any procedure under Chapter II.

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1087D/JM	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 99/02761	Date du dépôt international (jour/mois/année) 10/11/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 17/11/1998
Déposant SANOFI-SYNTHELABO et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 5 feuilles.

☐ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☒ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☒ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.



Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} — se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n^{os} — se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n^{os} — sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☒ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os} 1-13, 15 (partiellement)
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os} —

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☒ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.



1

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-12 (totalement) et 15 (partiellement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche Nocardia sp. SRL4988 et la souche même.

2. revendications: 1-11, 13 (totalement) et 15 (partiellement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche Streptomyces sp. SRL 5186 ainsi que la souche même.

3. revendications: 1-11, 14 (totalement) et 15 (partiellement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche Actinossinema sp. SRL 5189 et la souche même.



SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1-11 présentes ont trait à un produit/composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir, la capacité de liaison au récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR)

Les revendications couvrent tous les produits/composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels produits/composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le produit/composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé.

Toutes les revendications ont été recherchées mais la recherche a été limitée aux benzodiazépines mêmes et spécialement aux composés mentionnés dans la revendication 4 et la figure 7. (Art. 17.2 PCT)

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

